

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

VALORISATION DES CHAMPIGNONS FORESTIERS NORDIQUES
PAR L'ÉTUDE DE LEUR ACTIVITÉ BIOLOGIQUE
POUR DES APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES ET COSMÉCEUTIQUES.

PAR
PHILIPPE PLOURDE
B. Sc. (BIOLOGIE)

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

AOÛT 2016

RÉSUMÉ

La forêt boréale est l'une des plus importantes ressources naturelles présentes au Canada. L'exploitation de la biomasse forestière permet la production d'une vaste gamme de produits s'étendant au-delà du bois d'œuvre et des pâtes et papiers, notamment les PFNL (produits forestiers non ligneux), parmi lesquels on compte les champignons forestiers. Principalement utilisés à des fins culinaires, plusieurs espèces de champignons restent méconnues en ce qui concerne leurs propriétés pharmacologiques et cosmétologiques. Le but de ce projet visait à évaluer le potentiel biologique de plusieurs champignons de la forêt boréale pour des applications pharmaceutiques et cosméceutiques. Pour réaliser ce projet, quinze espèces ont été récoltées, séchées et extraites à l'aide de divers solvants. Les extraits obtenus ont été soumis à une batterie d'essais biologiques pour en évaluer le potentiel. Un extrait hexane/éthanol de *Pycnoporus cinnabarinus* a présenté la meilleure activité anticancéreuse observée avec des IC_{50} de $4,1 \pm 0,2$ et $4,1 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$ contre les lignées cancéreuses du poumon A549 et du colon DLD-1, respectivement. D'après les résultats, plusieurs espèces possèdent des activités anti-inflammatoire et antioxydante. Cet extrait a également inhibé la production de NO avec une IC_{50} de $1,9 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$. Les extraits de *Boletus edulis*, *Craterellus fallax* et *Morchella conica* ont stimulé significativement la croissance des fibroblastes. Une activité antibactérienne contre *S. aureus* a été détectée dans un extrait éthanolique d'*Hypomyces lactifluorum* avec des CMI de 12,5 et 50 $\mu\text{g/ml}$. En conclusion, plusieurs champignons possédant des propriétés biologiques intéressantes ont été identifiés. Ce projet a permis d'améliorer nos connaissances sur les propriétés biologiques de plusieurs espèces de champignons présentes au Québec jusqu'alors méconnus, contribuant ainsi à leur valorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier mon directeur le Dr Jean Legault ainsi que mon codirecteur le Dr André Pichette de m'avoir offert cette occasion de travailler sur ce projet. Ils m'ont été d'un grand soutien et porteurs de bons conseils pour m'aider à me guider à travers les étapes du projet. Aussi, je voudrais également mentionner l'aide précise de leur équipe de chercheurs du LASEVE pour m'avoir pris en charge au cours de ma maîtrise. Merci à Catherine Dussault et Karl Lalancette qui ont été d'une grande aide pour m'avoir aidé à être en mesure de pratiquer les essais d'activité biologique personnellement, de les comprendre et de les analyser. Ils m'ont également beaucoup apporté en matière de culture cellulaire et ont été de bonne compagnie à côtoyer. Merci aussi à Benoît Roger qui a été une grande source d'enrichissement en ce qui concerne les connaissances en chimie. Il m'a été d'une grande aide pour réaliser les protocoles d'extraction et les divers extraits analysés.

Je voudrais remercier les Dres Catherine Laprise et Valérie Legendre Guillemain ainsi que leur équipe du laboratoire de Gépromic pour leur collaboration et m'avoir permis d'utiliser certains de leurs appareils pour réaliser certaines de mes extractions.

Je voudrais également accorder une place spéciale pour ma conjointe, Ann Tremblay, qui a été un support moral indispensable pendant tout ce temps, que ce soit au travail ou à la maison. Merci aussi à toute ma famille pour leurs encouragements et leur soutien durant les années de ma maîtrise.

Enfin, je tiens à remercier la Coopérative de solidarité forestière de la Rivière-aux-Saumons ainsi que la compagnie FaunENord pour leur approvisionnement en champignons, sans

quoi ce projet n'aurait jamais eu lieu. Je voudrais également remercier le conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) d'avoir financé ce projet.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION	1
1.1 Problématique	2
1.2 Objectifs	4
1.2.1 Objectif général	4
1.2.2 Objectifs spécifiques	5
CHAPITRE II	6
REVUE DE LITTÉRATURE	6
2.1 Description des champignons	7
2.1.1 Taxonomie	7
2.1.2 Structure générale	8
2.1.3 Reproduction	8
2.1.4 Mode de vie	9
2.1.5 Distinction entre ascomycète et basidiomycète	10
2.2 Utilisation et marché des champignons au Québec	11
2.3 Descriptions des champignons forestiers comestibles étudiés	14
2.3.1 <i>Boletus edulis</i>	14
2.3.2 <i>Cantharellus cibarius</i>	17
2.3.3 <i>Cortinarius caperatus</i>	20
2.3.4 <i>Craterellus fallax</i>	21
2.3.5 <i>Craterellus tubaeformis</i>	22
2.3.6 <i>Hydnum repandum</i>	23
2.3.7 <i>Hydnum umbilicatum</i>	25
2.3.8 <i>Hypomyces lactifluorum</i>	26
2.3.9 <i>Gloeophyllum sepiarium</i>	27
2.3.10 <i>Grifola frondosa</i>	28

2.3.11 <i>Leccinum piceinum</i>	30
2.3.12 <i>Morchella conica</i>	31
2.3.13 <i>Ptychoverpa bohemica</i>	33
2.3.14 <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	34
2.3.15 <i>Tricholoma magnivelare</i>	36
2.4 Recherches en pharmacologie et cosmétologie	38
CHAPITRE III	40
Extraction des produits naturels des champignons.....	40
3.1 Champignons étudiés	41
3.2 Extractions de champignons.....	42
3.2.1 Extraction à reflux.....	42
3.2.2 Extraction des protéines.....	45
3.3 Rendements des extractions	45
3.3.1 Résultats	45
3.3.2 Discussion	48
CHAPITRE IV	50
Activité anticancéreuse	50
4.1 Introduction.....	51
4.2 Méthodologie	51
4.3 Résultats	53
4.4 Discussion	59
CHAPITRE V	62
Activités antibactérienne et antifongique	62
5.1 Introduction.....	63
5.1.1 Activité antibactérienne	63
5.1.2 Activité antifongique	64
5.2 Méthodologie	64
5.2.1 Activité antibactérienne	64
5.2.2 Activité antifongique	65
5.3 Résultats	65
5.4 Discussion	69
5.4.1 Activité antibactérienne	69
5.4.2 Activité antifongique	70
CHAPITRE VI.....	71

Activités cosméceutiques	71
6.1 Activité antioxydante	72
6.1.1 Introduction.....	72
6.1.2 Méthodologie	73
6.1.3 Résultats	75
6.1.4 Discussion	80
6.2 Activité anti-inflammatoire	84
6.2.1 Introduction.....	84
6.2.2 Méthodologie	86
6.2.3 Résultats	87
6.2.4 Discussion	92
6.3 Inhibition de la collagénase, de l'élastase et de la tyrosinase.....	94
6.3.1 Introduction.....	94
6.3.2 Méthodologie (anti-collagénase)	96
6.3.3 Méthodologie (anti-élastase).....	97
6.3.4 Méthodologie (anti-tyrosinase).....	98
6.3.5 Résultats	99
6.3.6 Discussion	102
6.4 Stimulation de la croissance des fibroblastes	103
6.4.1 Introduction.....	103
6.4.2 Méthodologie	103
6.4.3 Résultats	104
6.4.4 Discussion	105
CHAPITRE VII	106
CONCLUSION.....	106
CHAPITRE VIII	110
BIBLIOGRAPHIE.....	110

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LISTE DES CHAMPIGNONS FORESTIERS ÉTUDIÉS.....	41
TABLEAU 2 : RENDEMENTS EN POURCENTAGE (%) DES EXTRAITS DE CHAMPIGNONS SELON LE SOLVANT D'EXTRACTION UTILISÉ	47
TABLEAU 3 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DES EXTRAITS DE CHAMPIGNONS SUR 3 LIGNÉES CELLULAIRES.....	54
TABLEAU 4 : ÉVALUATION DES ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNE ET ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS DE CHAMPIGNONS SUR DEUX SOUCHES BACTÉRIENNES (E. COLI, S. AUREUS) ET UNE SOUCHE DE LEVURES (C. ALBICANS).....	66
TABLEAU 5 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS DE CHAMPIGNONS SELON LE TEST ORAC ET LE TEST SUR CELLULES.	77
TABLEAU 6 : ÉVALUATION DE L'EFFET DES EXTRAITS DE CHAMPIGNONS SUR L'INHIBITION DE LA PRODUCTION DE NO DES MACROPHAGES RAW 264.7.....	88
TABLEAU 7 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-COLLAGÉNASE, ANTI-ÉLASTASE ET ANTI-TYROSINASE DES EXTRAITS DE CHAMPIGNONS (IC50).	99

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : TAXONOMIE DES CHAMPIGNONS	7
FIGURE 2 : <i>BOLETUS EDULIS</i> (CÈPE D'AMÉRIQUE).....	15
FIGURE 3 : <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> (CHANTERELLE COMMUNE)	18
FIGURE 4 : <i>CORTINARIUS CAPERATUS</i> (PHOLIOTE RIDÉE)	21
FIGURE 5 : <i>CRATERELLUS FALLAX</i> (TROMPETTE DE LA MORT).....	22
FIGURE 6 : <i>CRATERELLUS TUBAEFORMIS</i> (CHANTERELLE EN TUBE)	23
FIGURE 7 : <i>HYDNUM REPANDUM</i> (HYDNE SINUÉ).....	24
FIGURE 8 : <i>HYDNUM UMBILICATUM</i> (HYDNE OMBILICUÉ).....	25
FIGURE 9 : <i>HYPOMYCES LACTIFLUORUM</i> (DERMATOSE DES RUSSULES)	26
FIGURE 10 : <i>GLOEOPHYLLUM SEPIARIUM</i> (LENZITE DES POUTRES)	28
FIGURE 11 : <i>GRIFOLA FRONDOSA</i> (POLYPORE EN TOUFFE).....	29
FIGURE 12 : <i>LECCINUM PICEINUM</i> (BOLET DES ÉPINETTES)	31
FIGURE 13 : <i>MORCHELLA CONICA</i> (MORILLE CONIQUE).....	32
FIGURE 14 : <i>PTYCHOVERPA BOHEMICA</i> (VERPE DE BOHÈME)	34
FIGURE 15 : <i>PYCNOPORUS CINNABARINUS</i> (PYCNOPORE CINNABRE)	35
FIGURE 16 : <i>TRICHOLOMA MAGNIVELARE</i> (TRICHOLOME À GRAND VOILE)	37
FIGURE 17 : RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE DES EXTRACTIONS DE CHAMPIGNONS EN SÉRIE	44
FIGURE 18 : DOSE-RÉPONSE DE L'EXTRAIT À L'HEXANE ET À L'ÉTHANOL DE <i>PYCNOPORUS CINNABARINUS</i> SUR TROIS LIGNÉES CELLULAIRES AVEC LE TEST DE RÉSAZURINE.	58
FIGURE 19 : DOSE-RÉPONSE DE PLUSIEURS EXTRAITS DE CHAMPIGNONS ACTIFS LORS DE L'ÉVALUATION DE L'EFFET DES EXTRAITS DE CHAMPIGNONS SUR L'INHIBITION DE LA PRODUCTION DE NO DES MACROPHAGES RAW 264.7.	91

FIGURE 20 : EFFET DES EXTRAITS SUR LA STIMULATION DE LA CROISSANCE DES FIBROBLASTES.	105
---	-----

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 PROBLÉMATIQUE

La forêt boréale constitue l'une des principales ressources naturelles au Québec et au Canada. Environ le tiers du territoire québécois est couvert par la forêt boréale, ce qui équivaut à près de 560 000 km² (Ministère de l'Énergie et des Ressources Naturelles 2015). La forêt boréale québécoise est principalement exploitée pour la production de bois d'œuvre et de produits de pâtes et papier à partir de la matière ligneuse. Les utilisations possibles de la biomasse forestière ne se limitent pas qu'à cela. La valorisation de la biomasse pourrait se faire, entre autres, par l'optimisation de l'exploitation de la matière ligneuse, mais également par le développement du secteur des produits forestiers non ligneux (PFNL). Les PFNL consistent essentiellement en l'ensemble des « biens d'origine biologique autres que le bois provenant des forêts, d'autres terres boisées et des arbres hors forêt » (FAO 2015). Les plantes herbacées, les produits des arbres tels que les graines, les fruits et la résine ainsi que les champignons en sont de parfaits exemples.

Les champignons comptent parmi les PFNL les plus populaires, principalement dû à la commercialisation des champignons comestibles. Au Canada, la vente des champignons a atteint une valeur totale dépassant les 370 millions de dollars en 2014 pour une production totale de plus de 110 000 tonnes (Statistique Canada 2015). Plusieurs espèces sont effectivement recherchées sur les marchés internationaux pour leur attrait gastronomique comme les chanterelles, les bolets et le matsutake. Bien que les champignons soient surtout consommés pour des raisons alimentaires, cela ne les empêche pas toutefois de trouver leur place dans d'autres secteurs d'activités. Le nombre

total d'espèces de champignons présentes sur Terre a été estimé à 140 000, dont 22 000 ont été identifiées. Plus de 2000 espèces de champignons sont répertoriés en tant que comestibles. Le nombre de champignons connus pour posséder des propriétés pharmacologiques d'intérêt a été estimé à environ 700 espèces (Lull, Wichers et Savelkoul 2005). Près de 200 espèces de champignons sont reconnues pour leurs vertus médicinales en plus d'être propres à la consommation (Dikeman *et al.* 2005). Seulement 10 % de ces espèces identifiées ont été le sujet d'études approfondies sur leurs propriétés biologiques (Ganeshpurkar, Rai et Jain 2010). Au Québec, près de 3000 espèces sont retrouvées sur le territoire et environ 400 d'entre elles sont comestibles (Tremblay et Olivier 2011).

Cependant, il y a un manque important de connaissances quant aux propriétés pharmacologiques et cosméceutiques de la majorité des champignons répertoriés au Québec. Plusieurs espèces comme le bolet des épinettes (*Leccinum piceinum*), la dermatose des russules, la trompette de la mort et la verpe de bohème (*Ptychoverpa bohemica*) n'ont jamais fait l'objet d'étude. Actuellement, plusieurs champignons sont utilisés dans le secteur alimentaire tels que le *Tricholoma magnivelare* (tricholome à grand voile), le cèpe d'Amérique (*Boletus edulis*), la morille conique (*Morchella conica*), la dermatose des russules (*Hypomyces lactifluorum*), l'armillaire ventru (*Catathelasma ventricosa*) ainsi que la chanterelle commune (*Cantharellus cibarius*) (Gévry *et al.* 2009). Est-il toutefois possible que les champignons du Québec puissent être utilisés à d'autres fins que la consommation alimentaire? Ce projet de recherche a été mis en place dans le but d'évaluer leur potentiel pour les secteurs pharmaceutique et cosméceutique.

1.2 OBJECTIFS

1.2.1 OBJECTIF GÉNÉRAL

- Évaluer l'activité biologique de plusieurs espèces de champignons comestibles retrouvées dans la forêt boréale pour des applications pharmaceutiques et cosméceutiques. Les principaux champignons qui ont été étudiés sont :

- *Boletus edulis* (Cèpe d'Amérique)
- *Cantharellus cibarius* (Chanterelle commune)
- *Cortinarius caperatus* (Pholiote ridée)
- *Craterellus fallax* (Trompette de la mort)
- *Craterellus tubaeformis* (Chanterelle en tube)
- *Gloeophyllum sepiarium* (Lenzite des poutres)
- *Grifola frondosa* (Polypore en touffe)
- *Hydnum repandum* (Hydne sinué)
- *Hydnum umbilicatum* (Hydne ombiliqué)
- *Hypomyces lactifluorum* (Dermatose des russules)
- *Leccinum piceinum* (Bolet des épinettes)
- *Morchella conica* (Morille conique)
- *Ptychoverpa bohemica* (Verpe de bohème)
- *Pycnoporus cinnabarinus* (Pycnopore cinnabre)
- *Tricholoma magnivelare* (Tricholome à grand voile)

1.2.2 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Afin d'atteindre cet objectif, nous devons compléter les tâches spécifiques suivantes :

- Identifier, récolter, sécher et broyer les champignons
- Extraire les métabolites secondaires, les polysaccharides et les protéines des champignons étudiées et évaluer le rendement d'extraction.
- Évaluer l'activité biologique des extraits à l'aide de tests biologiques
 - Cytotoxicité
 - Antioxydant
 - Anti-inflammatoire
 - Antibactérien
 - Antifongique
 - Anti-tyrosinase
 - Anti-collagénase
 - Anti-élastase
 - Stimulation de la croissance

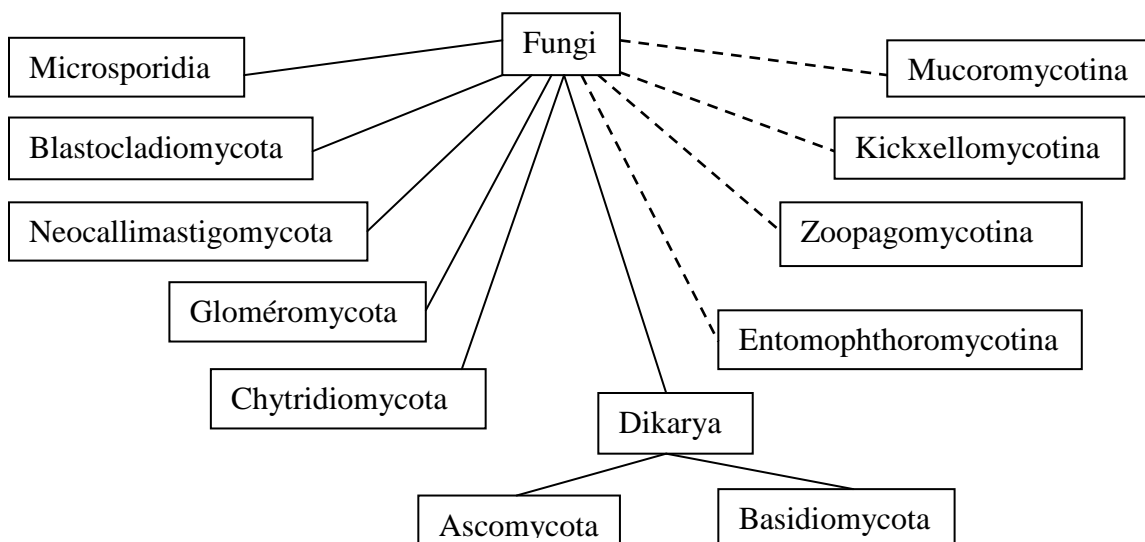
CHAPITRE II

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 DESCRIPTION DES CHAMPIGNONS

2.1.1 TAXONOMIE

Les champignons sont des organismes eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires regroupés sous le règne des *Fungi*. Ils sont répartis selon sept phylums : Microsporidia, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Chytridiomycota, Gloméromycota, Basidiomycota (basidiomycètes) et Ascomycota (ascomycètes). Les Zygomycota (zygomycètes) étaient autrefois classés en tant qu'un phylum à part entière des Fungi. La classification des champignons a cependant subi un remaniement suite à une récente étude scientifique, répartissant les zygomycètes parmi les Gloméromycota ainsi que quatre sous-phylums incertae sedis : Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina et Entomophthoromycotina (Hibbett et al. 2007). Les champignons dits « supérieurs », que l'on retrouve en forêt, sont membres du sous-règne Dikarya regroupant les basidiomycètes et les ascomycètes.



Ligne pointillée : Incertae sedis

Figure 1 : Taxonomie des champignons

2.1.2 STRUCTURE GÉNÉRALE

D'un point de vue microscopique, les champignons sont composés d'hyphes, des éléments filamenteux formés de longues chaînes de cellule continues ou ramifiées. Ces cellules sont séparées l'une de l'autre par des septums, une forme de barrière contenant généralement un pore laissant passer le cytoplasme. Le mycélium représente l'ensemble du réseau d'hyphes d'un même champignon, que l'on retrouve sous terre. Les champignons forestiers que l'on peut observer sur le sol sont en réalité la fructification du champignon, le carpophore (ou sporophore) contenant les spores prêtes à être disséminées dans l'environnement. Chaque cellule de l'hyphe peut contenir un noyau (monocaryotique), deux noyaux (dicaryotique) ou même plusieurs, ce qui les distingue des cellules animales et végétales. La paroi cellulaire des champignons est formée de plusieurs polysaccharides, dont la chitine, que l'on retrouve également dans l'exosquelette des arthropodes. On peut également y retrouver des glycoprotéines, des glucanes, des lipides ainsi que des glucides comme le glucose, le mannose, le galactose et le tréhalose (Ripert 2013).

2.1.3 REPRODUCTION

La croissance des hyphes se produit à partir des extrémités et se fait rapidement. Les champignons possèdent une méthode de division cellulaire différente de celle utilisée par les animaux et les plantes. Notamment, l'enveloppe nucléaire persiste tout au long de la mitose au lieu de se dissoudre et de se reformer. La formation du fuseau mitotique s'effectue à l'intérieur de l'enveloppe au lieu d'être dans le cytoplasme. De plus, les

champignons ne possèdent pas de centrioles pour former les microtubules, mais plutôt ce qu'on appelle des plaques polaires (Raven 2000).

Les champignons sont capables d'effectuer leur reproduction de manière sexuée ou asexuée. Lors d'une reproduction sexuée, deux hyphes haploïdes provenant d'individus différents se joignent pour former un hyphe diploïde suite à la fusion des deux noyaux. La reproduction asexuée s'effectue par une fragmentation des hyphes du mycélium. Les spores constituent le principal moyen de reproduction. Elles sont le produit de la méiose ayant lieu dans le carpophore, dans la région de l'hyménium. Le transport des spores peut prendre plusieurs formes. Généralement, elles sont acheminées par le vent, mais certaines sont visqueuses et peuvent adhérer aux arthropodes et autres organismes pouvant servir de vecteur. D'autres espèces de champignons (ex. les champignons du genre *Pilobolus*) ont développé une méthode consistant à propulser leurs spores dans les airs suite à la déchirure d'un renflement situé sous le sporange (organe produisant les spores) causée par une augmentation de la pression de turgescence (Raven 2000).

2.1.4 MODE DE VIE

Les champignons sont considérés comme étant des hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils doivent se nourrir à partir de sources organiques. Cependant, ils ne peuvent obtenir leur nourriture par phagocytose puisque leur paroi cellulaire est trop rigide pour effectuer une telle action. De par ce fait, ils doivent dégrader leur source alimentaire au moyen d'enzymes pour ensuite absorber les petites particules qui en résultent. Bien que les champignons soient tous hétérotrophes, ils se distinguent par leur fonction. Certains sont

saprophytes (se nourrissent à partir de matière organique morte), parasites (se nourrissent à partir de matière organique vivante aux dépens de l'hôte) ou symbiotes (s'associent avec d'autres organismes vivants pour une collaboration mutuelle comme les lichens et les mycorhizes). Des espèces de champignons sont même carnivores comme *Pleurotus ostreatus* (pleurote en huître) qui se nourrit de nématodes comme principale source d'azote. En effet, ce champignon comestible sécrète une substance paralysant les nématodes pour ensuite les envelopper avec ses hyphes et les digérer avec ses enzymes (Raven 2014).

2.1.5 DISTINCTION ENTRE ASCOMYCÈTE ET BASIDIOMYCÈTE

Comme indiqué précédemment, les champignons forestiers que l'on voit surgir du sol sont répartis principalement entre les ascomycètes et les basidiomycètes, tous les deux membres du sous-règne Dikarya. Les deux phylums ont pour caractéristique commune la formation, lors de la reproduction sexuée, d'un mycélium secondaire dicaryotique issu de la fusion entre deux hyphes provenant d'individus de types sexuels différents (Raven 2014). La principale distinction entre les deux est leur structure reproductrice et le processus de formation des spores.

Chez les basidiomycètes, la formation des spores (nommées basidiospores) s'effectue à partir de basides. Cette structure est retrouvée dans la face inférieure du basidiocarpe (ou carpophore). La fusion des deux noyaux (caryogamie) provenant de la reproduction sexuée s'effectue à l'intérieur des basides, suivie immédiatement de la méiose. Les quatre noyaux qui en résultent sont ensuite intégrés dans les basidiospores situées en périphérie des basides (Raven 2014).

Chez les ascomycètes, les spores (nommées ascospores) sont formées à l'intérieur de l'asque, une structure microscopique en forme de sac située à l'intérieur de l'ascocarpe. Comme chez les basidiomycètes, la caryogamie s'effectue à l'intérieur de l'asque, suivie d'une méiose pour obtenir quatre noyaux haploïdes. Toutefois, contrairement aux basidiomycètes, chaque noyau haploïde se divise par mitose pour obtenir finalement huit noyaux haploïdes. Ces derniers se retrouvent entourés d'une paroi pour former ainsi les ascospores, contenues dans l'asque jusqu'à sa rupture (Raven 2014).

Une autre différence majeure entre ces deux phylums concerne la reproduction asexuée. En effet, elle est plus fréquente chez les ascomycètes que chez les basidiomycètes. Les ascomycètes ont développé une structure particulière à cet effet : les conidies. Il s'agit de spores asexuées formées à l'extrémité d'hyphes modifiées, les conidiophores, qui sont ensuite relâchées sur un substrat adéquat peut former un nouveau mycélium (Raven 2014).

2.2 UTILISATION ET MARCHÉ DES CHAMPIGNONS AU QUÉBEC

Outre l'utilisation alimentaire ou gastronomique, les champignons peuvent être employés en pharmaceutique, nutraceutique et cosméceutique. En effet, ils sont utilisés dans la médecine traditionnelle ancestrale des pays orientaux tels que la Chine, le Japon et la Corée (Wasser 2014). *Ganoderma lucidum*, aussi appelé Lingzhi, reishi ou le « Champignon de l'immortalité », est possiblement l'exemple le plus populaire de champignon aux vertus médicinales (Bishop *et al.* 2015). Il contiendrait près de 400 composés bioactifs et possède de nombreuses propriétés pharmacologiques telles des effets antiviraux (dont le VIH), antibactériens, antitumoraux et antidiabétiques pour ne

citer que quelques exemples (Sanodiya *et al.* 2009). Il est utilisé également dans le traitement de certaines pathologies comme la leucémie et l'hépatite (Sanodiya *et al.* 2009). En Amérique du Nord, l'utilisation des champignons occupait une place importante dans la culture de certaines tribus amérindiennes. Par le passé, ils les employaient comme source de nourriture, mais également pour traiter des maux tels que le rhumatisme, les douleurs articulaires, les organes congestionnés ainsi la névralgie sciatique (Hobbs 2002). Par exemple, les Anishinaabeg utilisaient le *Fomitopsis officinalis* en tant que purgatif, particulièrement dans les cas d'empoisonnement, ainsi que le *Fomes fomentarius* comme substance styptique (agent antihémorragique agissant en contractant les vaisseaux sanguins) (Hobbs 2002).

Plusieurs champignons ont permis la découverte de composés ayant des propriétés pharmacologiques très intéressantes. Par exemple, les recherches portées sur l'amanite tue-mouches (*Amanita muscaria*) ont permis d'isoler la muscarine, un alcaloïde induisant une activation du système nerveux parasympathique (Kosentka *et al.* 2013). Ce composé présente un intérêt pour le traitement de la maladie d'Alzheimer puisque des récepteurs spécifiques muscariniques sont grandement exprimés dans le cerveau et les nerfs (Defant *et al.* 2015). On peut également mentionner la psilocybine, un alcaloïde contenu chez plusieurs champignons du genre *Psilocybe* agissant en tant qu'un agoniste de la sérotonine. Ce composé possède des propriétés anxiolytiques et agirait en tant qu'antidépresseur (Tyls, Palenicek et Horacek 2014).

Les champignons attirent également l'intérêt de l'industrie cosmétique à la recherche d'ingrédients actifs pour la peau. La cosmétologie réfère essentiellement au développement de produits ayant des propriétés thérapeutiques bénéfiques pour la peau

(Hyde *et al.* 2010). Les ingrédients blanchissants, les produits antirides et les hydratants sont parmi les plus recherchés. Il existe actuellement, sur le marché des ingrédients cosméceutiques, produits à partir de champignons. Par exemple, la compagnie Aveeno propose parmi sa gamme de produits « *Positively Ageless* » des crèmes anti-âge fabriquées à base de shiitake (*Lentinula edodes*) (Hyde, Bahkali et Moslem 2010). Une compagnie québécoise, le Laboratoire Pachaloha, a commercialisé une crème à base de chaga (*Inonotus obliquus*) qui aiderait à traiter certains problèmes de peau tels que l'eczéma et le psoriasis (Laboratoire Pachaloha 2015).

Actuellement, la principale utilisation des champignons cueillis dans la nature relève du domaine alimentaire, que ce soit en gastronomie ou consommation directe. Sur le marché mondial, il s'agit d'une industrie représentant plus de 2 milliards de dollars de ventes annuelles. Les espèces de champignons les plus commercialisées sont les chanterelles (1,25 G\$), le matsutake (500 M\$), le bolet cèpe (250 M\$) et la morille (100 M\$) (Martin et Darveau 2010). Au Canada, la cueillette commerciale de champignons forestiers est présente surtout en Colombie-Britannique. Le climat varié et le terrain montagneux de l'Ouest canadien sont des facteurs favorisant la croissance de champignons forestiers (Maltais-Lajoie 2013). De plus, la Colombie-Britannique jouit d'une proximité avec les marchés asiatiques, facilitant ainsi les exportations outre-mer (ex. : le matsutake auprès des Japonais). Les exportations canadiennes de champignons ont été évaluées à plus de 135 M\$ en 2014 (Industrie Canada 2015). Au Québec, l'industrie des champignons forestiers n'est pas aussi organisée que celui de l'Ouest canadien. Le climat rigoureux, le manque de connaissances ainsi qu'un marché local limité sont des raisons expliquant le développement plus lent de cette ressource (Gévry

2009). L'industrie connaît cependant une croissance depuis quelques années. En effet, la masse totale récoltée est passée de cinq tonnes en 2006 à près de 25 tonnes en 2008 (Gévry *et al.* 2009). Bien que la commercialisation des champignons comestibles québécois n'égale pas celle de la Colombie-Britannique, elle connaît tout de même en croissance.

2.3 DESCRIPTIONS DES CHAMPIGNONS FORESTIERS COMESTIBLES ÉTUDIÉS

2.3.1 BOLETUS EDULIS

Boletus edulis, aussi appelé le cèpe d'Amérique ou bolet comestible, est une espèce de champignon basidiomycète retrouvée en Amérique du Nord ainsi qu'en Europe (Kuo 2010c). Il représente à lui seul entre 10 et 15 % du marché international des champignons comestibles forestiers avec une valeur estimée à près de 250 millions de dollars (Maltais-Lajoie 2013).

Membre de la famille des Boletaceae, l'apparence de ce champignon consiste en un large chapeau brun d'une largeur pouvant aller de 6 à 20 cm, surmontant un pied blanc d'un diamètre relativement important, soit de 2 à 4 cm. Sa hauteur moyenne se situe entre 10 et 18 cm. Au Québec, *B. edulis* pousse généralement au sein des forêts d'épinettes de manière symbiotique en particulier avec l'épinette blanche. Sa présence dans les forêts de feuillus a déjà été observée, mais est plutôt rare (Gévry, Simard et Roy 2009; Kuo 2010c)



Figure 2 : *Boletus edulis* (Cèpe d'Amérique)

(Tiré de : Wood M. 2001 (mis à jour le 27-10-2015). *Boletus edulis* 1. Consulté le 22-11-2015, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Boletus_edulis_1.jpg)

B. edulis a été le sujet de nombreuses études au cours des dernières années afin de déterminer son potentiel bioactif. Ce champignon est porteur de plusieurs propriétés médicinales et cosméceutiques d'intérêt. Il est principalement reconnu pour ses effets antioxydants attribuables majoritairement à des produits naturels tels que les composés phénoliques simples, les flavonoïdes et les caroténoïdes (Vamanu et Nita 2013). Un extrait de *B. edulis* préparé à l'éthanol s'est révélé actif selon divers tests d'activité antioxydante (Tsai, Tsai et Mau 2007; Vamanu et Nita 2013). Un autre extrait, préparé avec 50 % d'éthanol cette fois, a obtenu une IC_{50} égale à $0,016 \pm 0,003$ mg/ml pour l'inactivation des radicaux DPPH (Vidovic *et al.* 2010). Des fractions liposolubles et hydrosolubles obtenues à partir d'un extrait de méthanol/acide acétique/eau ont présenté une activité totale de 131 ± 8 μ mol Fe(II)/g pour le test de FRAP (« Ferric-reducing antioxydant power ») et 32 ± 2 μ mol Trolox/g (Guo *et al.* 2012).

Cependant, les effets antioxydants de *B. edulis* ne se limitent pas uniquement aux composés phénoliques. Des polysaccharides ont également démontré des propriétés antioxydantes, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Selon une étude, un polysaccharide hydrosoluble (BEBP-3) s'est montré efficace contre les radicaux libres hydroxyles *in vitro* (Luo *et al.* 2012). De plus, cette molécule a également stimulé l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), une des enzymes impliquées dans la défense naturelle contre les radicaux libres de l'oxygène, lors de tests chez des souris à une concentration de 150 mg/kg. Des tests effectués sur une fraction de polysaccharides nommée BEPF60, issue d'une précipitation d'un extrait aqueux avec 60 % d'éthanol, ont indiqué que cette fraction possédait une capacité réductrice et une activité chélatrice significative. De plus, elle posséderait des propriétés inhibitrices contre les radicaux hydroxyles et superoxydes (Zhang *et al.* 2011).

Des extraits de polysaccharides et de glycoprotéines ont démontré des propriétés anticancéreuses contre certaines lignées cellulaires humaines. Une étude portant sur des fractions d'un extrait de polysaccharide hydrosolubles a indiqué qu'une des fractions (BE3) a inhibé de manière significative la prolifération de cellules d'adénocarcinome colorectal LS180 (Lemieszek *et al.* 2013). L'administration d'un polysaccharide extrait du cèpe d'Amérique à des concentrations de 100 et 400 mg/kg chez des souris inoculées avec des cellules cancéreuses rénales Renca a induit une diminution significative du volume tumoral sur une période de 32 jours (Wang *et al.* 2014). Un article rapporte, quant à lui, l'activité anticancéreuse d'une lectine extraite de ce champignon avec une inhibition de la prolifération cellulaire atteignant 92 % contre HT29 (cancer du côlon), 79

% contre HepG2 (cancer du foie) et 77 % contre MCF-7 (cancer du sein) à une concentration de 10 µg/ml (Bovi *et al.* 2011).

Les recherches ont également dévoilé la présence de molécules antiherpétiques contre HSV-1. Une fraction enrichie de polysaccharides, préparée à partir d'un extrait aqueux de *B. edulis*, a pu inhiber la réplication intracellulaire du virus avec une IC₅₀ de $6,0 \pm 0,6$ µg/ml et un index de sélectivité de 143 (Santoyo *et al.* 2012). Les β-glucanes, l'un des principaux types polysaccharides retrouvés dans les champignons, seraient les principaux responsables de cette activité.

2.3.2 *CANTHARELLUS CIBARIUS*

La chanterelle commune (*Cantharellus cibarius*), membre des Cantharellaceae, compte parmi les champignons les plus recherchés dans le domaine culinaire, particulièrement pour sa saveur. Elle est également connue sous le nom de « girolle » en France ou encore de chanterelle ciboire ici au Québec. Le commerce mondial de la chanterelle est estimé à une valeur fluctuant entre 1,2 et 2,5 milliards de dollars par année, ce qui représente près de 50 % du marché mondial de l'ensemble des champignons forestiers (Maltais-Lajoie 2013).



Figure 3 : *Cantharellus cibarius* (Chanterelle commune)

(Tiré de : Kunze A. 2007 (mis à jour le 14-11-2015). Chanterelle (*Cantharellus cibarius*). Consulté le 22-11-2015, <https://en.wikipedia.org/wiki/Cantharellus>.)

Ce basidiomycète de couleur jaune orange possède comme particularité physique, propre aux membres de son genre, un chapeau de forme convexe surmontant un pied creux. Cela donne à la chanterelle commune l'apparence d'une coupe. La hauteur de cette espèce varie habituellement entre 3 et 15 cm et le diamètre du chapeau se situe généralement entre 4 et 13 cm (Gévry, Simard et Roy 2009). Sa distribution s'étend à travers les terres boisées de plusieurs continents. Elle pousse à l'aide de mycorhize aux côtés de feuillus, surtout auprès de chênes ou dans les forêts de pins gris. Elle effectue sa fructification au cours de la période de juillet à août (Gévry, Simard et Roy 2009; Kuo 2015c).

C. cibarius a principalement été étudiée pour son potentiel antioxydant jusqu'à présent, tel que l'indique l'ensemble de la littérature. Notamment, un extrait au méthanol de ce champignon a présenté un effet inhibiteur de 74 % sur l'oxydation de l'acide

linoléique, se démarquant de plusieurs autres extraits au méthanol de diverses espèces de champignons, dont le cèpe d'Amérique (Palacios *et al.* 2011). Les propriétés antioxydantes observées chez *C. cibarius* seraient attribuables principalement aux composés phénoliques tels que l'acide homogentisique, l'acide gallique, l'acide caféique et la catéchine (Palacios *et al.* 2011; Vamanu et Nita 2014). *C. cibarius* contiendrait également des composés contribuant à l'atténuation des symptômes inflammatoires, notamment en inhibant la dénaturation des protéines, causée généralement par les radicaux libres, et possiblement en stabilisant la membrane des lysosomes, dont le contenu peut causer une inflammation une fois relâchée (Vamanu et Nita 2014). En effet, il a été démontré que des extraits alcooliques et aqueux de *C. cibarius* inhibent la dénaturation de l'albumine à 88 ± 2 % (extrait à l'éthanol), 86 ± 2 % (extrait au méthanol) et 61 ± 1 % (extrait à l'eau chaude) à une concentration de 10 mg/ml (Vamanu et Nita 2014). Selon le même article, ces extraits inhibaient également l'hémolyse des érythrocytes, causée par une hausse de la température. Le plus haut degré de protection enregistré est de 84 ± 1 % pour l'extrait à l'éthanol à une concentration de 10 mg/ml. Puisque la membrane des érythrocytes est analogue à celle des lysosomes, ces extraits pourraient également stabiliser la membrane lysosomale. (Vamanu et Nita 2014). Finalement, ces mêmes extraits possèdent également une activité anti-protéinase significative selon des concentrations allant de 2 à 10 mg/ml (Vamanu et Nita 2014). *C. cibarius* serait également une source d'agents antibactériens. Un article a rapporté son efficacité contre trois lignées bactériennes Gram positif, soient *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. La concentration minimale inhibitrice (CMI) obtenue

contre *B. cereus* et *S. aureus* était même inférieure à celle obtenue avec le contrôle positif, l'ampicilline (Barros *et al.* 2008).

2.3.3 *CORTINARIUS CAPERATUS*

La pholiote ridée (*Cortinarius caperatus*) est un basidiomycète de la famille des Cortinariaceae poussant habituellement au nord et à l'est de l'Amérique du Nord. Autrefois, ce champignon comestible était classé en tant que *Rozites caperatus*, mais des études sur l'ADN de cette espèce ont permis de la classer en tant que cortinaire. Ses caractéristiques physiques primaires consistent en un pied blanc surmonté d'un chapeau plat ou de forme conique de couleur brunâtre (Kuo 2011).

En matière d'apparence, son chapeau beige est de forme convexe et relativement large avec un diamètre allant de 5 à 12 cm. Il possède comme particularité physique une démarcation sous la forme d'un anneau foncé au sommet du chapeau. La tige est de couleur blanche et est munie d'un anneau membraneux. La taille moyenne du champignon se situe entre 7 et 15 cm tandis que son poids moyen est de 33 g. On retrouve la pholiote ridée principalement parmi les populations d'épinettes noires et sa récolte se pratique entre juillet et septembre (Gévry, Simard et Roy 2009). En ce qui concerne son potentiel bioactif, aucun article dans la littérature scientifique n'en fait mention.



Figure 4 : *Cortinarius caperatus* (Pholiote ridée)

(Tiré de : Opiola J. 2013 (mis à jour le 10-10-2013).
Cortinarius caperatus. Consulté le 23-11-2015,
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cortinarius_caperatus_G7.jpg.)

2.3.4 *CRATERELLUS FALLAX*

Également nommée la fausse corne d'abondance ou « black trumpet » en anglais, la trompette de la mort (*Craterellus fallax*) est un membre la famille des Cantharellaceae. Ce basidiomycète comestible possède les caractéristiques typiques d'une chanterelle, c'est-à-dire une tige creuse avec un chapeau en forme d'entonnoir à son sommet. Tel que son nom anglais l'indique, elle est complètement noire. Elle peut atteindre une taille variant entre 5 et 9 cm et son chapeau possède une largeur de 3 à 5 cm. Ce champignon pousse directement sur le sol généralement sous les feuillus, mais aussi au pied des conifères. On peut les cueillir entre la mi-juillet et septembre et souvent en petits peuplements denses (Labbé 2014a; Kuo 2015a). Le potentiel bioactif de *C. fallax* est encore inconnu jusqu'à ce jour.



Figure 5 : *Craterellus fallax* (Trompette de la mort)

(Tiré de : Hollinger J. 2008 (mis à jour le 15-07-2014). *Horn of Plenty*. Consulté le 26-05-2016, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Horn_of_Plenty.jpg)

2.3.5 *CRATERELLUS TUBAEFORMIS*

La chanterelle en tube, ou *Craterellus tubaeformis*, est un basidiomycète comestible faisant partie de la famille des Cantharellaceae. Son apparence est similaire à celle de la chanterelle commune, bien que la chanterelle en tube soit de taille plus modeste, soit entre 4 et 8 cm de hauteur. Son chapeau en forme d'entonnoir a une couleur variant entre le brun jaunâtre et le brun noirâtre et son diamètre peut atteindre de 2 à 6 cm. Cette espèce pousse particulièrement dans les milieux humides des forêts de conifères ou mixtes et sa récolte se fait à partir de la mi-juillet jusqu'à la fin du mois d'octobre (Gévry, Simard et Roy 2009). On la retrouve à travers la mousse du sol forestier ou sur des souches d'arbres en décomposition (Kuo 2015b). Aucune activité

biologique n'a été détectée chez *C. tubaeformis* selon la littérature scientifique disponible.



Figure 6 : *Craterellus tubaeformis* (Chanterelle en tube)

(Tiré de L Silfverberg M. 2007 (mis à jour le 15-02-2011).
Craterellus tubaeformis. Consulté le 23-11-2015,
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Craterellus_tubaeformis_1345904803_69350246bb_o.jpg.)

2.3.6 *HYDNUM REPANDUM*

L'hydne sinué (*Hydnum repandum*), un autre Hydnaceae, est plus communément appelé le pied-de-mouton. Le qualificatif « sinué » provient de la forme que possède la marge de son chapeau. Ce dernier est légèrement convexe et possède un diamètre entre 3 et 8 cm. Sa couleur varie entre l'orange et le saumon et la partie inférieure du chapeau est recouverte de petits aiguillons de 3 à 10 mm comme pour *Hydnum umbilicatum*. *H. repandum* peut atteindre une taille de 3 à 12 cm et possède un poids moyen entre 20 et 30 g. Ce champignon comestible est principalement retrouvé dans les forêts de conifères,

comme les sapinières à mousses, ou mixtes et sa récolte s'effectue de juillet à septembre (Gévry, Simard et Roy 2009).

H. repandum a déjà fait l'objet d'études afin d'évaluer son potentiel antioxydant. Cependant, les résultats montrent que les extraits de *H. repandum* sont faiblement actifs avec une EC_{50} de 29 mg/ml et une capacité inhibitrice de la peroxydation des lipides de 33 % à 20 mg/ml. Cette faible activité peut être partiellement expliquée par la faible concentration en composés phénoliques que contient ce champignon, soit $0,51 \pm 0,02$ mg d'équivalent d'acide gallique par g de champignon (Heleno *et al.* 2010). Il a été démontré qu'un extrait au méthanol de ce champignon aurait une activité antibiotique contre certaines souches bactériennes, en particulier contre *E. coli* (Ozen *et al.* 2011).



Figure 7 : *Hydnum repandum* (Hydne sinué)

(Tiré de : Rockefeller A. 2012a (mis à jour le 21-01-2014). *Hydnum umbilicatum* Peck. Consulté le 23-11-2015, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2012-01-30_Hydnum_umbilicatum_Peck_197711.jpg.)

2.3.7 *HYDNUM UMBILICATUM*

L'hydne ombiliqué (*Hydnum umbilicatum*) est un basidiomycète comestible de la famille des Hydnaceae poussant généralement parmi la sphaigne ainsi que dans les milieux mal drainés des forêts de conifères (Labbé 2014b). Son chapeau, de forme convexe, lui donne une apparence ressemblant légèrement à celle d'un entonnoir. La dépression au centre du chapeau n'est pas aussi importante que chez les chanterelles. Sa couleur se situe dans les teintes d'orange et il peut avoir une taille allant de 3 à 8 cm. Son chapeau, quant à lui, peut atteindre un diamètre de 2 à 6 cm (Gévry, Simard et Roy 2009). Il possède comme particularité physique des « épines » recouvrant la surface inférieure de son chapeau. Il se distingue de l'hydne sinué par une dépression sur le sommet de son chapeau. Il est possible de le cueillir au cours de la période juillet – octobre (Labbé 2014b). Les informations concernant le potentiel bioactif de *H. umbilicatum* sont pratiquement inexistantes.



Figure 8 : *Hydnum umbilicatum* (Hydne ombiliqué)

(Tiré de : Rockefeller A. 2012b (mis à jour le 26-05-2014). *Hydum repandum*. Consulté le 23-11-2015, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2012-08-29_Hydnum_repandum_L_256175_crop.jpg.)

2.3.8 *HYPOMYCES LACTIFLUORUM*

La dermatose des russules (*Hypomyces lactifluorum*) est également appelée le « champignon homard » pour sa couleur orange vif. Il s'agit d'un ascomycète de la famille des Hypocreaceae résultant du parasitage d'un champignon du genre *Russula* ou *Lactarius* par *Hypomyces lactifluorum*. Cette espèce comestible peut être retrouvée dans toutes les provinces du Canada à travers la forêt boréale, ainsi qu'à plusieurs endroits aux États-Unis, au Mexique et au Guatemala (Rochon *et al.* 2009).

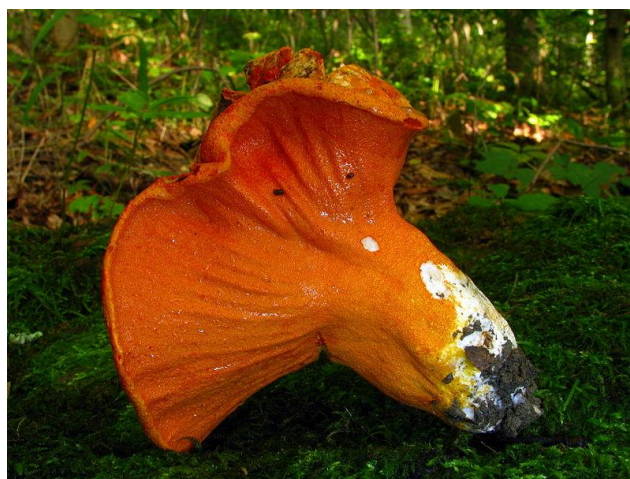


Figure 9 : *Hypomyces lactifluorum* (Dermatose des russules)

(Tiré de : Molter D. 2011 (mis à jour le 21-11-2012).

Hypomyces lactifluorum. Consulté le 23-11-2015 :

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hypomyces_lactifluorum_169126.jpg.)

Son apparence déformée et irrégulière ainsi que sa couleur la rend particulièrement facile à identifier en milieu naturel (Kuo 2003; Umene *et al.* 2008). Sa taille est relativement importante, comparée aux autres espèces, pouvant aller de 15 à 35

cm de hauteur ainsi que de largeur pour le chapeau. On la retrouve généralement sur le bord des chemins de sables dans les forêts de pins gris et de sapins baumiers. Sa récolte s'effectue entre le mois de juillet et septembre (Gévry, Simard et Roy 2009). Jusqu'à présent, la littérature ne rapporte pas d'activité biologique pour ce champignon.

2.3.9 *GLOEOPHYLLUM SEPIARIUM*

Le lenzite des poutres (*Gloeophyllum sepiarium*) est un polypore saprophyte de la famille des Gloeophyllaceae retrouvé sur les souches de bois mort dans les forêts nord-américaines. Son chapeau dépourvu de pied est de couleur brune et possède une bordure jaune-orange à ses extrémités. Il peut atteindre une taille d'environ 12 cm et sa face inférieure est garnie de lamelles, un trait particulier pour un polypore (Kuo 2010d). Ce champignon pousse généralement sur des espèces telles que les épinettes, le mélèze et les saules et il est responsable de leur décomposition (Niemelä 1985). Il est à préciser que ce champignon, contrairement aux autres présentés jusqu'à présent, n'est pas comestible pour l'être humain.

La littérature scientifique concernant les propriétés biologiques de ce champignon est à peu près inexistante. Toutefois, une étude portant sur un extrait de *G. sepiarium* a révélé une activité antioxydante chez cette espèce selon le test FRAP (« Ferric Reducing Antioxydant Power ») avec une valeur de 88 ± 4 mmol Trolox / kg (Sulkowska-Ziaja *et al.* 2012). Cette activité n'est toutefois pas corrélée avec la teneur en composés phénoliques du champignon.



Figure 10 : *Gloeophyllum sepiarium* (Lenzite des poutres)

(Tiré de : Opiola J. 2012 (mis à jour le 08-02-2014).

Gloeophyllum sepiarium. Consulté le 23-11-2015,

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gloeophyllum_sepiarium_G3.jpg.)

2.3.10 *GRIFOLA FRONDOSA*

Le polypore en touffe (*Grifola frondosa*) est connu sous de nombreux noms. Son nom populaire est la poule des bois tandis qu'au Japon, il est appelé maitake qui signifie « champignon dansant » (Ulbricht *et al.* 2009; Kuo 2010a). Il s'agit d'un champignon très populaire en Asie en raison de ses vertus médicinales et de ses qualités culinaires (Fang *et al.* 2012). Ce basidiomycète relativement imposant (15 à 60 cm de largeur) de la famille des Meripilaceae possède une apparence particulière : physiquement, il ressemble à un amalgame arborescent composé de multiples chapeaux fusionnés ensemble (Kuo 2010a).



Figure 11 : *Grifola frondosa* (Polypore en touffe)

(Tiré de : Harvey P. 2009 (mis à jour le 01-01-2015). *Grifola frondosa*. Consulté le 23-11-2015, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Grifola_frondosa_57503.jpg.)

Des fractions de polysaccharides possédant un potentiel antioxydant ont démontré des résultats positifs selon plusieurs essais notamment la mesure de l'activité anti-radicalaire envers les radicaux hydroxyles, superoxydes et DPPH (Chen *et al.* 2012). Ces mêmes fractions de polysaccharides ont également inhibé la peroxydation lipidique et contiendraient des chélateurs de fer. Un extrait de polysaccharide obtenu grâce à l'activité de la cellulase a présenté une capacité à inactiver les radicaux hydroxyles avec une EC_{50} de $75 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ (Fan *et al.* 2011). Cette activité s'est révélée plus forte que celle de la vitamine C avec le même test. Une autre étude supporte la présence de composés antioxydants chez *G. frondosa* (Yeh *et al.* 2011).

Les polysaccharides ont suscité beaucoup d'intérêt de la part des chercheurs pour trouver de nouvelles molécules bioactives. Entre autres, le polysaccharide D-fraction

possède un potentiel anticancéreux après avoir démontré son activité après exposition chez des souris inoculées avec des cellules tumorales de sarcome 180 (Nanba, Hamaguchi et Kuroda 1987). Ce même polysaccharide a fait l'objet de recherches approfondies par d'autres chercheurs dans le but de mieux comprendre ses effets anticancéreux et leurs relations avec des mécanismes immunomodulateurs (Matsui, Kodama et Nanba 2001; Kodama *et al.* 2002; Kodama, Komuta et Nanba 2003; Kodama *et al.* 2005). D'autre part, un hétéropolysaccharide nommé GFPS1b a inhibé près de 70 % la prolifération cellulaire de cellules tumorales mammaires MCF-7 (Cui *et al.* 2007). Des essais effectués sur des cellules humaines du cancer de l'estomac ont permis de détecter une activité anticancéreuse par induction de l'apoptose (Shomori *et al.* 2009). Un β -glucane extrait avec du NaOH 5 %, GFPBW1, induirait une activité antitumorale par l'activation de macrophages chez des cellules de souris (Fang *et al.* 2012). Du côté de l'activité anti-inflammatoire, des agaricoglycérines contenus chez *G. frondosa* favoriseraient la réduction des niveaux de cytokines TNF- α et IL-1 β . Ces métabolites secondaires réduiraient également la production de protéines tels qu'iNOS, ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule-1 ») et COX-2 (« cyclooxygenase-2 ») (Han et Cui 2012).

2.3.11 *LECCINUM PICEINUM*

Le bolet des épinettes, tel que son nom commun l'indique, est un basidiomycète faisant partie de la famille des Boletaceae. Il est également connu sous le nom scientifique de *Leccinum piceinum*. Ce bolet comestible possède un chapeau dont la couleur se situe dans les teintes de brun rougeâtre et possède un diamètre allant de 5 jusqu'à 15 cm. Son chapeau surmonte un pied blanc parsemé de rugosités brunes ou noires. Il peut atteindre une taille située entre 8 à 20 cm et possède un poids moyen de 65

g. On peut le retrouver dans les forêts d'épinettes, de pins gris ainsi que dans les forêts mixtes. Sa récolte s'effectue au cours de la période de la mi-juin jusqu'à la mi-septembre (Gévry, Simard et Roy 2009). Actuellement, aucune activité biologique n'a été recensée pour le bolet des épinettes dans la littérature scientifique disponible.



Figure 12 : *Leccinum piceinum* (Bolet des épinettes)

(Tiré de : Rose C. 2006 (mis à jour le 29-11-2014). *Leccinum piceinum*. Consulté le 22-11-2015, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leccinum_piceinum.jpg)

2.3.12 *MORCHELLA CONICA*

La morille conique (*Morchella conica*) est un ascomycète de la famille des Morchellaceae. Il s'agit de l'une des espèces de champignons les plus recherchées dans le domaine culinaire (Tremblay et Olivier 2011). Chez certains taxonomistes, *M. conica* ainsi que les espèces *Morchella angusticeps* et *Morchella elata*, sont considérés comme étant des synonymes représentant l'ensemble des « morilles noires » (Winder 2006). Elle possède une apparence bien distincte des membres des autres familles de champignons.

En effet, elle possède un chapeau creux parsemé d'alvéoles sur sa surface et ce dernier noircit avec l'âge (Labbé 2014c). Il s'agit d'un champignon de petite taille, ayant une hauteur allant de 2,5 à 5 cm et un chapeau avec un diamètre de 2 à 6 cm. Cette espèce a tendance à pousser à la suite du passage d'un feu dans l'année qui suit l'évènement dans les pessières noires et les pinèdes grises ainsi que dans les forêts de feuillus ayant le peuplier comme essence principale. Sa récolte se fait entre les mois d'avril et de juin (Gévry, Simard et Roy 2009).



Figure 13 : *Morchella conica* (Morille conique)

(Tiré de : Hempel J. 2008 (mis à jour le 23-05-2013).

Morchella conica. Consulté le 23-11-2015,

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Morchella_conica_LC0125.jpg.)

Des tests effectués sur un extrait à l'éthanol de *M. conica* ont permis de détecter une activité antioxydante avec des résultats de 267 $\mu\text{g/ml}$ selon le test de DPPH et une inhibition de 78 % de l'oxydation de l'acide linoléique à une concentration de 80 $\mu\text{g/ml}$ (Turkoglu *et al.* 2006). Un extrait méthanolique a, quant à lui, obtenu une efficacité d'adsorption des radicaux DPPH de plus de 80 % à une concentration de 4,5 mg/ml et de 79 ± 2 % à 40 $\mu\text{g/ml}$ contre les radicaux ABTS. Ce même extrait posséderait également un pouvoir chélateur de 86 ± 3 % à 50 $\mu\text{g/ml}$ (Gursoy *et al.* 2009).

Un extrait à l'éthanol de *M. conica* a déjà été testé contre plusieurs souches bactériennes Gram positif et Gram négatif. Il s'est avéré être actif contre *Micrococcus flaveus*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* (Turkoglu *et al.* 2006). Des polysaccharides de *M. conica* extraits à partir du bouillon de culture ont inhibé significativement la production d'oxyde nitrique (NO), lors de tests chez des macrophages de souris RAW 264.7, à partir de 50 $\mu\text{g/ml}$. D'autres polysaccharides, extraits directement du mycélium, ont eu un effet similaire à partir de 25 $\mu\text{g/ml}$. Dans les deux cas, les polysaccharides n'ont induit aucune cytotoxicité chez les macrophages. Au contraire, une importante prolifération cellulaire a été observée à partir de 400 $\mu\text{g/ml}$ (Huang *et al.* 2012).

2.3.13 *PTYCHOVERPA BOHEMICA*

La verpe de Bohème (*Ptychoverpa bohemica* ou *Verpa bohemica*) est un champignon comestible de la famille des Morchellaceae. Cependant, ce qui la distingue des morilles est le fait que son chapeau est uniquement attaché au sommet de la tige. Sa taille moyenne se situe entre 6 et 15 cm et la largeur de son chapeau varie entre 1 et 5 cm.

Cet ascomycète pousse généralement de manière solitaire sous les peupliers dans les territoires humides. *P. bohémica* peut être cueillie entre la mi-avril et la mi-mai (Kuo 2005). À notre connaissance, la littérature scientifique ne rapporte pas d'activité biologique pour ce champignon.



Figure 14 : *Ptychoverpa bohémica* (Verpe de bohème)

(Tiré de : Hollinger J. 2008 (mis à jour le 26-04-2015). *Verpa bohémica*. Consulté le 23-11-2015, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Verpa_bohemica1.jpg.)

2.3.14 *PYCNOPORUS CINNABARINUS*

Connu sous le nom taxonomique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le pycnopore cinabre est un basidiomycète faisant partie de la famille des Polyporaceae. Il est principalement retrouvé dans les forêts de l'hémisphère nord. Il s'agit d'un champignon de type saprophyte poussant généralement sur les souches de bois mort. *P. cinnabarinus*

se distingue physiquement par la couleur de son chapeau d'un rouge – orange éclatant. Il peut atteindre une taille entre 2 et 13 cm et une épaisseur de 2 cm (Kuo 2010b). Ce champignon n'est pas comestible pour l'être humain.



Figure 15 : *Pycnoporus cinnabarinus* (Pycnopore cinnabre)

(Tiré de : Krisp H. 2012 (mis à jour le 23-04-2013). Zinnober-Tramete, *Pycnoporus cinnabarinus*. Consulté le 23-11-2015, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zinnober-Tramete_Pycnoporus_cinnabarinus.jpg.)

Ce champignon posséderait plusieurs propriétés pharmacologiques et cosméceutiques. Une étude portant sur des extraits d'acétone et acétate d'éthyle a pu révéler la présence d'activités antitumorale, antivirale contre l'herpès et la polio, antioxydante et anti-inflammatoire (Dias et Urban 2009). Les conclusions de cette étude attribuent la présence de l'activité antitumorale détectée à la cinnabarine, un des pigments

retrouvés chez *P. cinnabarinus*, et au peroxyde d'ergostérol, un dérivé de l'ergostérol qui est le principal stérol retrouvé dans la composition de la membrane cellulaire fongique (Zheng *et al.* 2013). Mis à part la découverte de ces propriétés bioactives, *P. cinnabarinus* a principalement été étudié pour les mécanismes biochimiques des laccases contenues chez cette espèce. Les laccases présentent un intérêt particulier dans la production de pâtes et papier par leur capacité à délignifier la matière végétale (Andreu et Vidal 2013).

2.3.15 *TRICHOLOMA MAGNIVELARE*

Le *Tricholoma magnivelare* (tricholome à grand voile) est une espèce de champignon ayant un fort potentiel commercial, notamment en Colombie-Britannique, dans les états de Washington, de l'Oregon et de la Californie ainsi qu'au Mexique (Fogarty 1998). En effet, le Japon a connu un déclin majeur de ses populations de *Tricholoma matsutake* au cours des cinquante dernières années. Cela a amené le pays à importer en grands volumes des champignons forestiers, dont *T. magnivelare* qui est une espèce proche de *T. matsutake*, afin de satisfaire la demande locale (Tremblay et Olivier 2011).



Figure 16 : *Tricholoma magnivelare* (tricholome à grand voile)

(Tiré de : Pearsall, P. 2015 (mis à jour le 09-05-2016). Matsutake (*Tricholoma magnivelare*). U.S. Fish and Wildlife Service. Consulté le 24-08-2016, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tricholoma_magnivelare_\(23222064233\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tricholoma_magnivelare_(23222064233).jpg))

Tricholoma magnivelare (tricholome à grand voile) est un basidiomycète de la famille des Tricholomataceae retrouvé dans les forêts de conifères à travers plusieurs pays. À maturité, il a l'apparence d'un champignon blanc présentant une décoloration brune avec un chapeau presque plat présentant un lit de lamelles sur sa surface inférieure (Kuo 2006). Il peut atteindre une taille variant de 4 à 15 cm et son chapeau peut avoir un diamètre de 5 à 20 cm (Kuo 2006). Aucun article scientifique rapportant une quelconque activité biologique chez *T. magnivelare* n'est disponible jusqu'à ce jour.

2.4 RECHERCHES EN PHARMACOLOGIE ET COSMÉTOLOGIE

La recherche de nouvelles molécules est alimentée par le besoin constant de renouveler les traitements disponibles pour les divers maux pouvant affecter la santé humaine. Il y aura toujours cette nécessité de trouver de nouvelles molécules ayant des propriétés bioactives que ce soit pour développer un traitement plus efficace que ceux déjà existants ou encore parce qu'un micro-organisme pathogène a développé une résistance contre un traitement couramment utilisé. Dans le domaine pharmaceutique, les molécules ayant des propriétés anticancéreuses, antivirales, antibactériennes et antifongiques représentent des cibles de choix pour la recherche.

En cosméceutique, la recherche se focalise sur les composés actifs intéressants pour soulager les problèmes en lien avec la peau, plus particulièrement les troubles en lien avec le vieillissement de la peau. Le vieillissement de la peau est un phénomène auquel plusieurs changements physiologiques ocurrent dans la région cutanée. Par exemple, il peut s'y produire une dégradation des composantes primaires de la peau, un amincissement progressif de l'épiderme, une baisse de l'activité enzymatique des mélanocytes ainsi qu'un aplanissement de la jonction derme-épiderme (Jacobson et Flowers 1996; McCullough et Kelly 2006; Ganceviciene *et al.* 2012; Farage *et al.* 2013) . Visuellement, ces changements peuvent entraîner de nombreux problèmes tels que la formation de rides, une peau plus fragile, une pigmentation inégale, une capacité de guérison amoindrie. Les recherches en cosméceutiques se concentrent généralement sur les composés actifs ayant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires ainsi que les agents inhibant l'activité d'enzymes impliqués dans le vieillissement de la peau

comme la collagénase. Ceux qui stimulent la croissance des fibroblastes et la production de protéines structurales de la peau sont également recherchés.

Dans les prochains chapitres, il est question des procédures d'extraction employées pour isoler les produits naturels des champignons. Ensuite, l'évaluation de leur potentiel anticancéreux, antibactérien et antifongique est abordée. Le chapitre suivant traite du potentiel antioxydant et anti-inflammatoire des champignons ainsi que de leur effet sur la stimulation de la croissance des fibroblastes de peau humaine et l'inhibition de l'activité d'enzymes impliquées dans le vieillissement de la peau (collagénase, élastase et tyrosinase). Pour finir, un bref retour sur les points marquants de ce projet est présenté en tant que conclusion.

CHAPITRE III

EXTRACTION DES PRODUITS NATURELS DES CHAMPIGNONS

3.1 CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS

Près de quinze espèces de champignons récoltés dans la forêt boréale ont été étudiées dans le cadre de ce projet. Ces champignons sont une gracieuseté de la Coopérative de solidarité forestière de la Rivière-aux-Saumons, située à La Doré au Saguenay-Lac-Saint-Jean, et de la compagnie FaunENord basée à Chibougamau. La liste des champignons étudiés jusqu'à présent est décrite au tableau 1.

Tableau 1 : Liste des champignons forestiers étudiés

Nom scientifique	Nom français
<i>Boletus edulis</i>	Cèpe d'Amérique
<i>Cantharellus cibarius</i>	Chanterelle commune
<i>Cortinarius caperatus</i>	Pholiote ridée
<i>Craterallus fallax</i>	Trompette de la mort
<i>Craterellus tubaeformis</i>	Chanterelle en tube
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Lenzite des poutres
<i>Grifola frondosa</i>	Polypore en touffes ou Maitake
<i>Hydnum repandum</i>	Hydne sinué
<i>Hydnum umbilicatum</i>	Hydne ombiliqué
<i>Hypomyces lactifluorum</i>	Dermatose des russules
<i>Leccinum piceinum</i>	Bolet des épinettes
<i>Morchella conica</i>	Morille conique
<i>Ptychoverpa bohemica</i>	Verpe de bohème
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Pycnopore cinabre
<i>Tricholoma matsutake</i>	Matsutake

3.2 EXTRACTIONS DE CHAMPIGNONS

3.2.1 EXTRACTION À REFLUX

Afin d'extraire les composés possibles des champignons, des extractions séquentielles sont effectuées sur du matériel végétal commun pour une série de solvants à reflux (hexane, éthanol, eau, solution aqueuse d'oxalate d'ammonium 2 % et solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 5 %). Parmi ces extraits, ceux obtenus avec les solutions d'oxalate d'ammonium et d'hydroxyde de sodium conduisent après le refroidissement à un précipité solide et une solution aqueuse (phase liquide). Les extraits à l'hexane et à l'éthanol servent à obtenir majoritairement les métabolites secondaires, des molécules de faible poids moléculaire telles que des acides gras, des terpénoïdes, des alcaloïdes, des stéroïdes, des glycosides, des polycétides et des phénylpropanoïdes (Hanson 2003). Les extraits aqueux, quant à eux, servent plutôt à récupérer les polysaccharides solubles (extrait à l'eau) et non solubles dans l'eau (extraits à l'oxalate d'ammonium et à l'hydroxyde de sodium).

Dans un premier temps, les champignons ont été premièrement réduits en poudre au moyen d'un robot culinaire en inox afin de faciliter les futures extractions. Ensuite, une masse de 5 à 10 g de champignons broyés a été resuspendue dans un volume de 100 ml d'hexane de grade ACS dans un ballon en verre. Le tout a été chauffé à reflux pendant 2 heures. Par la suite, l'extrait d'hexane a été récupéré par centrifugation à 5 000 rpm pendant 3 min et le culot a été conservé pour les extractions suivantes. La masse de champignons solides restante dans le ballon a été suspendue à nouveau, cette fois-ci avec 100 ml d'éthanol anhydre. Le mélange ainsi obtenu a été chauffé à reflux pour ensuite

récupérer l'extrait d'éthanol par centrifugation. Les extraits à l'hexane et à l'éthanol secs sont obtenus après évaporation sous vide des solvants organiques.

La séquence d'extractions est complétée en ajoutant 100 ml d'eau distillée à la quantité résiduelle de champignons, sans sécher préalablement la matière végétale. La solution hétérogène aqueuse est chauffée à reflux pour une période de 3 heures. L'eau a été récupérée par centrifugation et l'étape a été répétée avec un autre volume de 100 ml d'eau distillée pour ensuite combiner les deux volumes d'eau. Cette procédure a été répétée une autre fois avec deux volumes d'une solution aqueuse d'oxalate d'ammonium, puis une dernière fois avec deux volumes d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH). Afin de précipiter les molécules extraites (constituées principalement de polysaccharides), de l'éthanol anhydre a été ajouté aux 200 ml d'extrait aqueux jusqu'à obtenir un ratio éthanol/eau de 4 : 1. Après un repos d'une heure de la solution hétérogène éthanol-eau, cette dernière a été centrifugée à 5000 x g pendant 10 minutes. Le précipité a été ensuite récupéré et congelé pour être lyophilisé jusqu'à obtenir un extrait sec. Les mélanges éthanol/eau non précipités pour les extraits à l'eau distillée et au NaOH de certains champignons ont été évaporés avec l'aide d'un évaporateur sous vide de type « Rocket » et ensuite lyophilisés afin d'obtenir des extraits dits secondaires. Ces extraits dits « secondaires » sont définis en tant qu'« Eau II » et « NaOH II » dans les prochains tableaux. Un schéma résumant cette série d'extractions est présentée dans la prochaine figure.

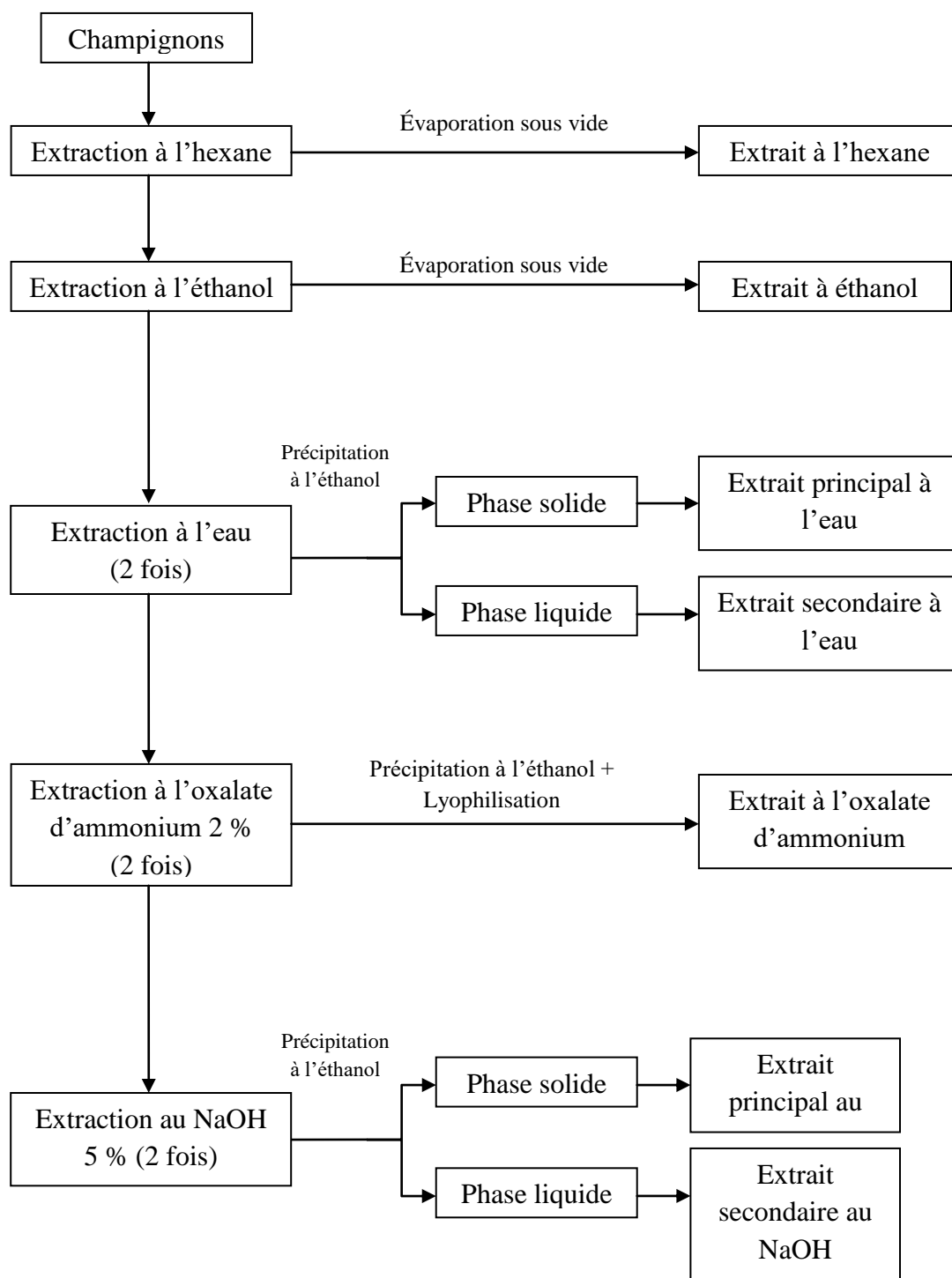


Figure 17 : Résumé de la procédure des extractions de champignons en série

3.2.2 EXTRACTION DES PROTÉINES

La procédure d'extraction des protéines de champignons s'effectue à partir d'une méthode différente de la série d'extractions à reflux décrite précédemment. Pour ce faire, une masse de champignon en poudre est suspendue dans une solution tampon de Tris-HCl 50 mM à pH 7,0. Premièrement, il est à noter que les protéines sont obtenues à partir du matériel végétal non préalablement extrait. Les cellules de champignons sont ensuite lysées à l'aide d'une sonde à ultrasons. Ensuite, une solution d'additifs composée de Triton X-100, de NaCl et de glycérol a été ajoutée à la suspension de champignons pour obtenir les concentrations finales d'additifs suivantes : Triton X-100 [1 %], NaCl [150 mM] et glycérol [5 %]. Le tout a été conservé au réfrigérateur pendant 1 heure sous agitation puis centrifugé centrifugation à 200 000 x g afin de séparer les débris cellulaires. Finalement, les protéines ont été précipitées au moyen de la méthode au sulfate d'ammonium (Goldstein *et al.* 2007; Chen, Wang et Wu 2009). Cette technique consiste à précipiter les protéines en fonction du pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium. Une fois les protéines précipitées, l'extrait de protéines a été dialysé pendant une période de 24 heures afin d'éliminer le sulfate d'ammonium présent dans l'extrait pour ne conserver que les protéines.

3.3 RENDEMENTS DES EXTRACTIONS

3.3.1 RÉSULTATS

Le rendement des extractions effectuées est présenté en pourcentage dans le tableau 2. Les données concernant les extraits à l'oxalate d'ammonium (Oxalate) et au (NaOH) pour *C. cibarius* et *H. lactifluorum* n'ont pas été compilées dû à un oubli de

noter la masse. Les extraits secondaires à l'eau et à l'hydroxyde de sodium n'ont pas tous été réalisés pour plusieurs champignons puisqu'ils n'ont commencé à être préparés qu'à mi-chemin durant l'étape des extractions. Pour *G. sepiarium*, *G. frondosa* et *P. cinnabarinus*, les extraits n'ont pas pu tous être réalisés par faute de temps. Leurs extraits à l'hexane et à l'éthanol ont été combinés afin d'économiser du temps et de s'assurer d'avoir assez de matière pour effectuer les essais. Pour *C. tubaeformis* et *M. conica*, leurs extraits secondaires à l'eau et au NaOH ont été combinés pour économiser du temps pour les essais. Pour l'extraction à l'hexane, les rendements obtenus se situent entre 1,7 et 7,5 % avec *H. repandu* ayant le meilleur rendement. Avec l'éthanol comme solvant, les rendements varient entre 5,3 et 14,6 %, ce dernier ayant été obtenu avec *T. magnivelare*. Du côté des extraits à l'eau distillée, les rendements vont de 0,1 jusqu'à 13,2 %. *M. conica* est le champignon ayant l'extrait à l'eau distillée avec le meilleur rendement. Les extraits secondaires de ces derniers ont eu des rendements allant de 2,0 à 31,7 %. L'extrait secondaire à l'eau avec le meilleur rendement provient de *C. caperatus*. L'extraction à l'oxalate d'ammonium a permis d'obtenir des extraits avec des rendements situés entre 17,9 et 59,6 %, *T. magnivelare* ayant donné le rendement le plus élevé. Avec la solution aqueuse de NaOH comme solvant, les rendements d'extraction obtenus se situent entre 22,0 et 37,1 % avec *L. piceinum* ayant donné le plus élevé. Les rendements des extractions secondaires de NaOH, quant à eux, varient entre 3,9 et 14,9 %. Pour ces extraits, *P. bohemica* est celui ayant eu le plus haut rendement. Finalement, l'extraction des protéines a donné des rendements allant de 4,7 % jusqu'à un maximum de 32,8 %. Ce rendement de 32,8 % a été obtenu avec *B. edulis*.

Tableau 2 : Rendements en pourcentage (%) des extraits de champignons selon le solvant d'extraction utilisé

Champignon	Rendement selon le solvant d'extraction (%) ^a							
	Hexane	Éthanol	Eau	Oxalate	NaOH	Eau II	NaOH II	Protéines
<i>Boletus edulis</i>	2,9	7,2	6,1	56,9	30,8	6,7	8,1	32,8
<i>Cantharellus cibarius</i>	3,3	8,9	1,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,1
<i>Cortinarius caperatus</i>	4,6	9,9	1,4	52,3	28,6	31,7	n.d.	12,1
<i>Craterellus fallax</i>	2,2	6,4	3,8	56,0	30,7	15,9	10,6	4,7
<i>Craterellus tubaeformis</i>	3,8	5,5	2,2	49,2	36,4	7,3		5,7
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	8,5		0,1	17,9	22,0	2,0	n.d.	n.d.
<i>Grifola frondosa</i>	2,2		1,3	23,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Hydnum repandum</i>	7,5	11,6	2,7	51,6	25,1	22,3	8,3	13,2
<i>Hydnum umbilicatum</i>	5,7	9,3	2,6	43,9	34,7	n.d.	n.d.	6,2
<i>Hypomyces lactifluorum</i>	1,7	5,3	8,6	n.d.	n.d.	n.d.	3,9	9,2
<i>Leccinum piceinum</i>	2,8	12,2	3,5	51,8	37,1	11,1	5,7	29,7
<i>Morchella conica</i>	3,3	9,4	13,2	57,7	27,5	13,1		9,9
<i>Ptychoverpa bohemica</i>	2,2	9,3	7,4	41,0	n.d.	16,8	14,9	9,6
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	6,0		1,0	17,8	n.d.	4,9	n.d.	n.d.
<i>Tricholoma matsutake</i>	3,0	14,6	1,8	59,6	24,3	n.d.	n.d.	11,2

a : Le rendement est le ratio (en %) de la masse d'extrait obtenu par rapport à la masse sèche de champignon utilisée pour l'extraction.

n.d. : Non déterminé

3.3.2 DISCUSSION

Les extractions de métabolites secondaires démontrent que les extraits à l'éthanol ont un meilleur rendement que ceux réalisés à l'hexane. On constate aussi que les extraits secondaires à l'eau (Eau II) ont un meilleur rendement que les extraits primaires. Il semblerait que l'ajout d'éthanol ne permet de précipiter qu'une fraction des polysaccharides solubles dans l'eau, la majeure partie étant encore dans le mélange eau/éthanol. Une suggestion à proposer, pour une éventuelle mise au point de la méthode d'extraction, serait d'éliminer l'étape de la précipitation par l'éthanol et de passer directement à la lyophilisation, du moins pour une série d'extractions préliminaires.

D'après les hauts rendements obtenus pour les extraits à l'oxalate d'ammonium et au NaOH, il est fortement possible que l'extrait contienne une grande quantité de soluté provenant de la solution aqueuse utilisée (oxalate d'ammonium 2 % ou NaOH 5 %). En effet, ces deux extraits représentent à eux seuls près des trois quarts de la masse sèche de champignon utilisée avant les extractions. Il est plausible que l'ajout de l'éthanol a non seulement précipité les polysaccharides des champignons, mais également une partie du soluté de la solution aqueuse. Cette méthode nécessite quelques améliorations afin de séparer le plus possible le soluté de l'extrait. Selon une étude portant sur un polysaccharide extrait de *Grifola frondosa* à partir d'une solution aqueuse de NaOH 5 %, il faudrait neutraliser le NaOH contenu dans l'extrait aqueux avec de l'acide chlorhydrique (HCl) pour ensuite dialyser l'extrait neutralisé avec de l'eau courante (Fang *et al.* 2012). Le chlore contenu dans l'acide se lierait avec le sodium du NaOH pour former du chlorure de sodium (NaCl), qui est facilement éliminable par dialyse. Il faut cependant prêter attention à la limite de poids moléculaire de l'appareil de dialyse

pour empêcher le plus possible les molécules extraites de passer la barrière et éviter ainsi les pertes.

L'extraction des protéines a permis d'obtenir des rendements intéressants, considérant le fait qu'il s'agissait d'une première tentative d'extraction de protéines à partir de champignons pour le laboratoire. En effet, le plus petit rendement enregistré est de 4,7 % pour *Craterellus fallax* tandis que le plus haut a été de 32,8 % avec *Boletus edulis*. Fait intéressant, *Boletus edulis* et *Leccinum piceinum* ont eu des rendements très élevés comparés aux autres espèces. Il est à noter que ces deux espèces font toutes les deux partie de la famille des Boletaceae, alors la richesse en protéines est peut-être une caractéristique propre à cette famille. Il s'agit là toutefois que d'une hypothèse. Des études supplémentaires sur la composition en protéines sont nécessaires avant d'affirmer quoi que ce soit.

CHAPITRE IV

ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE

4.1 INTRODUCTION

Le traitement le plus couramment utilisé pour traiter le cancer est la chimiothérapie. Ce traitement consiste à administrer un composé qui cible les cellules cancéreuses afin de d'empêcher leur prolifération dans l'organisme. Malheureusement, la chimiothérapie s'accompagne souvent d'effets secondaires chez le patient. En effet, les agents anticancéreux affectent également les cellules saines. Ces effets se manifestent par des symptômes tels que la perte de cheveux, des troubles gastro-intestinaux ainsi que l'aplasie médullaire (Société canadienne du cancer 2015). Afin de contrer ce problème, les chercheurs tentent de développer de nouveaux traitements qui sont plus sélectifs envers les cellules cancéreuses. Il existe actuellement plusieurs tests qui permettent d'évaluer l'activité anticancéreuse et la sélectivité d'extraits ou de composés. Dans le cadre de ce projet, l'effet des extraits de champignon a été évalué sur des cellules cancéreuses du poumon et du côlon ainsi que sur des cellules saines.

4.2 MÉTHODOLOGIE

Le potentiel anticancéreux des extraits a été évalué grâce à un test mesurant la cytotoxicité des échantillons contre trois lignées cellulaires d'origine humaine, soient des cellules de carcinome pulmonaire A549 (ATCC CCL-185), d'adénocarcinome colorectal DLD-1 (ATCC CCL-221) ainsi que des fibroblastes de peau WS-1 (ATCC : CRL-1502). La mesure de la cytotoxicité s'effectue avec la combinaison de deux tests employant deux fluorochromes distincts : la résazurine et le Hoechst. La résazurine, une molécule non fluorescente est métabolisée par les cellules vivantes en résorufine fluorescente. Ce test permet donc de quantifier le nombre de cellules vivantes. Le Hoechst, quant à lui, est un

agent intercalant qui devient fluorescent une fois qu'il s'est inséré entre les bases d'ADN. La fluorescence est proportionnelle à la quantité de cellules.

Afin d'évaluer la cytotoxicité des extraits, des microplaques à 96 puits à fond plat (BD Falcon) ont étéensemencées avec 5×10^3 cellules par puits pour chaque lignée et incubées pour la nuit à 37 °C pour permettre leur adhésion. Par la suite, des concentrations croissantes d'extraits variant de 1,56 à 200 µg/ml ont été ajoutées puis les microplaques ont été incubées pendant 48 heures à 37 °C. Après l'incubation, un volume de 100 µl d'une solution de résazurine 2 % a été ajouté dans chaque puits et les plaques ont été incubées pendant 2 heures à 37 °C. La fluorescence émise par la résorufine a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre automatisé « Fluoroskan Ascent Fl » selon une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'émission de 590 nm (O'Brien *et al.* 2000). Cet appareil consiste en un lecteur de microplaques automatisé capable d'effectuer des lectures de la fluorescence émise par les agents chimiques comme la résazurine et le Hoescht.

Pour le test de Hoechst, les microplaques ont été lavées avec du HBSS puis les cellules ont été lysées par incubation des cellules pendant 2 heures en présence de 100 µl d'une solution contenant 0,01 % de SDS. Les cellules ont ensuite été congelées à - 80 °C puis décongelées avant d'ajouter 100 µl d'une solution d'Hoechst 30 µg/ml dans du TNE 2X. Après incubation des plaques à température ambiante pendant 2 heures, la fluorescence a été mesurée l'aide du fluorimètre Fluoroskan (λ excitation : 355 nm, λ émission : 460 nm) (Rago, Mitchen et Wilding 1990). L'étoposide, un agent anticancéreux connu, a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en concentration qui inhibe 50 % de la croissance cellulaire (IC₅₀).

4.3 RÉSULTATS

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité anticancéreuse sont présentés dans le tableau 3. L'extrait à l'hexane et à l'éthanol de *P. cinnabarinus* est celui ayant démontré le meilleur potentiel anticancéreux. En effet, une sélectivité pour les cellules cancéreuses est observable d'après les valeurs d'IC₅₀ pour les lignées cancéreuses (A549 et DLD-1) sept à dix fois inférieures à celles pour les fibroblastes (WS-1). Bien que moins cytotoxique, l'extrait à l'eau distillée de *P. cinnabarinus* présente également un potentiel anticancéreux. Il est à noter que deux autres extraits, soient celui à l'oxalate d'ammonium de *G. frondosa* et celui de protéines de *P. bohemica*, présentent une sélectivité particulière pour A549 d'après les résultats du test à la résazurine. Les résultats indiquent que l'extrait d'oxalate d'ammonium de *G. sepiarium* est actif surtout contre DLD-1. Les extraits ayant eu une IC₅₀ inférieure à 100 µg/ml sont considérés comme étant actifs.

Tableau 3 : Évaluation de l'activité cytotoxique des extraits de champignons sur 3 lignées cellulaires.

Champignon	Solvant d'extraction	IC ₅₀ [µg/ml] ^a					
		Résazurine			Hoechst		
		A549 ^b	DLD-1 ^c	WS-1 ^d	A549	DLD-1	WS-1
<i>Boletus edulis</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Cantharellus cibarius</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Cortinarius caperatus</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	193 ± 3	175 ± 34	≥ 200	≥ 200

a : Concentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire

b : Carcinome pulmonaire humain

c : Adénocarcinome colorectal humain

d : Fibroblastes humains

*** : La valeur d'écart-type est supérieure à celle de la moyenne**

Champignon	Solvant d'extraction	IC ₅₀ [µg/ml]					
		Résazurine			Hoechst		
		A549	DLD-1	WS-1	A549	DLD-1	WS-1
<i>Craterallus fallax</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	172 ± 27	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	175 ± 74	≥ 200	≥ 200	137 ± 12	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Craterellus tubaeformis</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II + NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Hydnum repandum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	118 ± 12	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	192 ± 24	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200

Champignon	Solvant d'extraction	IC ₅₀ [µg/ml]					
		Résazurine			Hoechst		
		A549	DLD-1	WS-1	A549	DLD-1	WS-1
<i>Hydnum umbilicatum</i>	Hexane	195 ± *	191 ± *	177 ± *	176 ± 31	167 ± 8	113 ± *
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate d'ammonium	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	126 ± 14	192 ± 28	≥ 200
<i>Hypomyces lactifluorum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	128 ± 14	155 ± 22	136 ± 60	115 ± 4	140 ± 8	≥ 200
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Hexane + Éthanol	87 ± 23	172 ± 133	>200	128 ± 5	163 ± 21	>200
	Oxalate	>200	50 ± 10	>200	>200	43 ± 2	161 ± 46
	Eau II	>200	>200	>200	>200	>200	101 ± 14
<i>Grifola frondosa</i>	Hexane + Éthanol	>200	140 ± 29	>200	152 ± 8	114 ± 37	45 ± 6
	Eau	>200	>200	>200	57 ± 5	50 ± 4	>200
	Oxalate	16 ± 5	143 ± 16	>200	>200	>200	>200
<i>Leccinum piceinum</i>	Hexane	192 ± *	156 ± 11	191 ± *	157 ± 11	185 ± *	165 ± *
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200

Champignon	Solvant d'extraction	IC ₅₀ [µg/ml]					
		Résazurine			Hoechst		
		A549	DLD-1	WS-1	A549	DLD-1	WS-1
<i>Morchella conica</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II + NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	197 ± 45	≥ 200	≥ 200
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Hexane + Éthanol	4,1 ± 0,2	4,1 ± 0,3	31 ± 3	3,0 ± 0,2	3,4 ± 0,2	42 ± 2
	Eau	16 ± 3	33 ± 4	101 ± 23	24 ± 2	28 ± 1	175 ± 20
	Eau II	41 ± 8	19 ± 5	21 ± 5	30 ± 1	35 ± 5	>200
	Oxalate	25 ± 5	8 ± 1	17 ± 3	10,4 ± 0,6	15 ± 1	>200
<i>Ptychoverpa bohemica</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	47 ± 11	110 ± 26	105 ± *	62 ± 11	104 ± 12	≥ 200
<i>Tricholoma magnivelare</i>	Hexane	124 ± 3	132 ± 17	115 ± *	138 ± 6	126 ± 14	111 ± *
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	193 ± 19	193 ± 14	178 ± 5	56 ± 11	131 ± 14	≥ 200
Contrôle		IC ₅₀ [µM]					
Étoposide		14 ± 2	3,0 ± 0,5	>50	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	>50

L'exposition des lignées cellulaires à l'extrait hexane/éthanol de *P. cinnabarinus* a induit une dose-réponse, telle qu'illustrée dans la figure 18. Un taux de survie presque nul ($\approx 0\%$) est observable à partir de $12,5\ \mu\text{g/ml}$ d'extrait pour A549 et $25\ \mu\text{g/ml}$ pour DLD-1. Pour WS-1, un taux de survie nul est observable seulement à partir de $100\ \mu\text{g/ml}$ d'extrait. Cette nette différence entre les cellules cancéreuses et les fibroblastes sains témoigne ainsi du caractère sélectif de cet extrait pour les cellules cancéreuses.

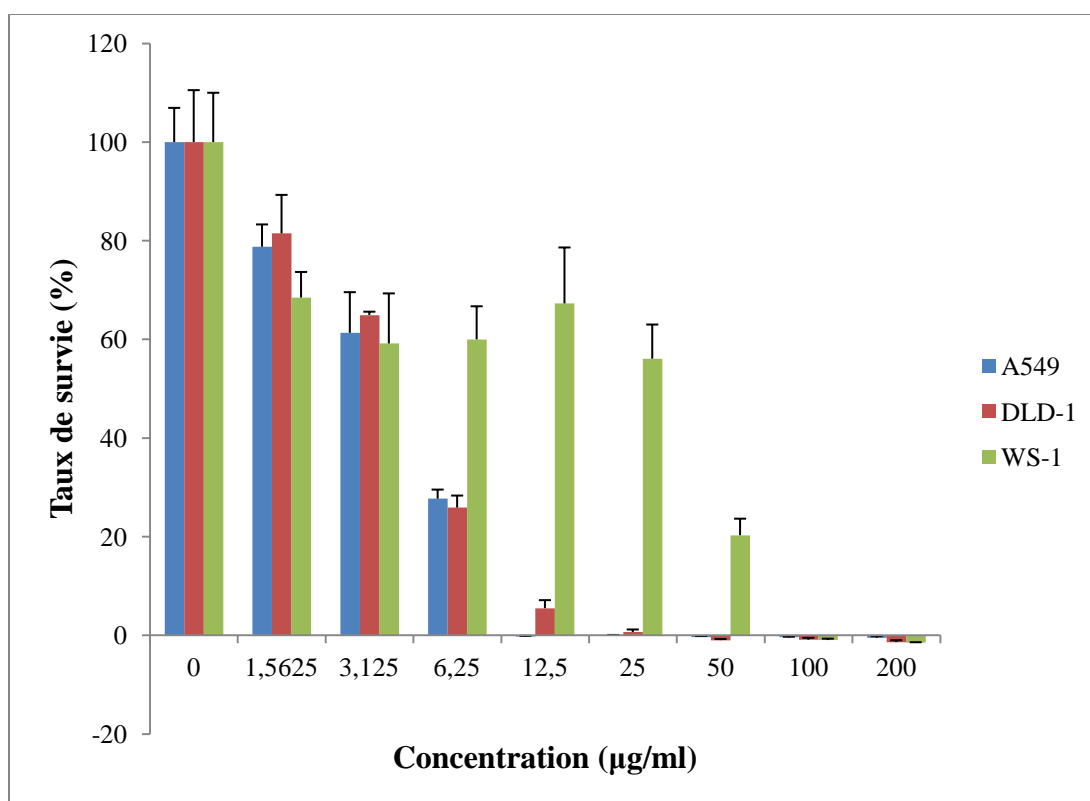


Figure 18 : Dose-réponse de l'extrait à l'hexane et à l'éthanol de *Pycnoporus cinnabarinus* sur trois lignées cellulaires avec le test de résazurine.

4.4 DISCUSSION

Pour d'abord considérer un extrait comme étant intéressant dans la recherche d'anticancéreux, il faut qu'il présente une activité sélective pour les cellules cancéreuses. Dans le domaine du développement de traitements contre le cancer, cette sélectivité est importante afin d'administrer un traitement chez un patient en évitant le plus possible les effets secondaires.. Les résultats de *P. cinnabarinus* démontrent que ce dernier possède un caractère sélectif pour les cellules cancéreuses. Cette sélectivité est intéressante puisqu'il s'agit de l'une des caractéristiques les plus importantes pour le développement d'agents anticancéreux. Une seule étude portant sur les propriétés pharmacologiques de ce champignon a été publiée jusqu'à ce jour. Les résultats publiés dans cette dernière concordent avec ceux obtenus présentement (Dias et Urban 2009). Selon Dias et Urban, divers extraits à base d'acétone et d'éthanol de *P. cinnabarinus* possèdent une activité antitumorale après avoir été testés sur des cellules murines de leucémie (P388) avec des IC₅₀ allant de 7,4 à 60,7 ng/ml. Ils ont également isolé deux composés qui présentent, d'après eux, une faible activité antitumorale, soit la cinnabarine (IC₅₀ = 13 µM à 1 mg/ml) et le peroxyde d'ergostérol (IC₅₀ > 20 µM à 1 mg/ml). D'après leurs conclusions, ces deux composés seraient responsables de l'activité anti-tumorale qu'ils ont observée chez *P. cinnabarinus*. La cinnabarine est un pigment naturel contenant le chromophore phenoxazone (Smania *et al.* 2003) tandis que le peroxyde d'ergostérol est un métabolite secondaire retrouvé chez plusieurs autres espèces fongiques (Wang 2012; Ma *et al.* 2013; Wu *et al.* 2013). Cependant, aucune information n'est disponible concernant le mode d'action anticancéreuse de ces composés. Des études plus approfondies sur cet extrait sont nécessaires afin de déterminer quel ou quels composés sont responsables de

l'activité anticancéreuse observée chez *P. cinnabarinus*. Il faudra effectuer un fractionnement de l'extrait à l'hexane et à l'éthanol et refaire les essais sur les fractions afin de pouvoir éventuellement isoler les composés actifs.

Le potentiel anticancéreux de *G. frondosa* a été rapporté dans de nombreux articles scientifiques et cette activité a été associée à la présence des polysaccharides. Toutefois, il s'agit généralement de polysaccharides obtenus à partir d'extraits à l'eau (Deng *et al.* 2009; Masuda *et al.* 2010; Soares *et al.* 2011) ou à l'hydroxyde de sodium (Fang *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013) et non à partir d'oxalate d'ammonium. La première mention remonte jusqu'en 1984 avec des extraits de polysaccharides testés sur des cellules tumorales de sarcome 180 inoculées chez des souris (Ohno *et al.* 1984). Le plus haut taux d'inhibition observée a été de 92 % avec une dose quotidienne de 40 µg administrée à chaque souris sur une période de 10 jours. Étant donné la nature de l'extrait, il s'agirait probablement d'un polysaccharide ou d'un complexe polysaccharidique non soluble dans l'eau. De plus, cet extrait démontre une spécificité pour la lignée A549, étant inactif contre DLD-1.

À notre connaissance, la littérature scientifique ne fait aucunement mention du potentiel anticancéreux de *P. bohemica*. La cytotoxicité observée sur les cellules A549 exposées à l'extrait de protéines de *P. bohemica* représente donc une découverte intéressante.

Bien que la grande majorité des extraits n'ait pas démontré d'activité anticancéreuse, l'absence de cytotoxicité peut en réalité représenter un point positif pour la préparation de formulations cosméceutiques topiques. En effet, une grande importance

est accordée au caractère non toxique des composés actifs lors du développement de produits cosméceutiques. Dans une formulation topique, les composés actifs sont concentrés suffisamment pour induire l'effet thérapeutique désiré de manière significative chez l'utilisateur. Cependant, il faut prendre garde à la concentration utilisée pour éviter de causer des effets secondaires indésirables chez la personne. Moins un composé est toxique pour les cellules de la peau, plus il est possible d'augmenter sa concentration pour améliorer son efficacité en tant qu'ingrédient cosméceutique. Si une activité cosméceutique est observée dans un extrait, cette absence de cytotoxicité jouerait donc en faveur d'un développement de produits cosméceutiques à partir des composés actifs. Il serait intéressant de tester la cytotoxicité de ces composés contre d'autres lignées cellulaires épithéliales comme les kératinocytes, les mélanocytes et les cellules de Langerhans.

CHAPITRE V

ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNE ET ANTIFONGIQUE

5.1 INTRODUCTION

5.1.1 ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

La résistance aux antibiotiques constitue un problème majeur dans le domaine de la santé. Il s'agit du développement de stratégies chez des bactéries visant à diminuer l'efficacité d'un traitement, ce qui favorise ainsi sa propagation. Son impact se fait ressentir notamment lorsque le traitement d'une infection avec un antibiotique de première intention comme la pénicilline se révèle inefficace. Il faut donc recourir à des médicaments qui peuvent s'avérer plus coûteux (OMS 2015). Les bactéries résistantes peuvent recourir à des stratégies telles que la dégradation des antibiotiques ou leur expulsion hors de la bactérie pour résister aux traitements. Ils peuvent même modifier leur structure pour empêcher les antibiotiques de les reconnaître et de s'insérer à l'intérieur (Penesyan, Gillings et Paulsen 2015). Le mauvais usage des antibiotiques a favorisé au fil du temps l'émergence de souches bactériennes résistantes. L'utilisation des antibiotiques en tant que facteurs de croissance pour les animaux d'élevage est un exemple d'un tel usage. Dans le domaine de la santé, l'arrêt de l'usage des antibiotiques avant la fin du traitement d'un patient contribue également au développement d'une résistance chez les bactéries. Un autre exemple typique est l'usage abusif des médicaments pour la prévention et le traitement des infections chez l'humain et les animaux (Canada 2014). Considérant que le problème de résistance aux antibiotiques constitue un enjeu majeur, il est impératif de rechercher de nouvelles molécules aux propriétés antibactériennes afin de développer des traitements efficaces contre les infections bactériennes.

5.1.2 ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE

L'amphotéricine B, connu sous le nom de Fungizone®, est l'un des agents antifongiques les plus utilisés pour traiter les infections à levures ou à moisissures. Sa popularité est justifiée notamment par son bas prix, comparativement à d'autres produits comme la *caspofungin* ou la *fluconazole*, et par le fait qu'elle est efficace contre la plupart des levures du genre *Candida*, qui sont spécifiques aux humains (Belkherroubi-Sari *et al.* 2013). Cependant, son usage est limité principalement par sa toxicité (Sugar 1995). Ses effets secondaires peuvent provoquer une altération du système urinaire qui peut mener à l'insuffisance rénale, à la perte de contrôle des urines et à l'acidose des tubules (Deray, Mercadal et Bagnis 2002). Il est donc pertinent de développer de nouveaux traitements antifongiques

5.2 MÉTHODOLOGIE

5.2.1 ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant la méthode de microdilution décrite par Banfi *et al* avec quelques modifications (Banfi, Scialino et Monti-Bragadin 2003). Les bactéries sont ensemencées dans des microplaques 96 puits à fond plat à une densité de 5×10^3 pour *E. coli* bactérie gram-négatif (ATCC 25922) et 40×10^3 pour *S. aureus* bactérie gram-positif (ATCC 25923) par puits dans un volume de 100 μ L de bouillon nutritif (Difco). Des concentrations croissantes d'extraits variant entre 1,56 et 200 μ g/ml ont été ajoutées avec un volume de 100 μ L par puits. La concentration finale de DMSO dans le milieu de culture a été maintenue à 0,1 % (v/v) pour éviter la toxicité. Les microplaques ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C. L'absorbance a été

mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Varioskan (Thermo, Labsystems) à une longueur d'onde de 600 nm. Les résultats sont exprimés en concentration minimale inhibant 90 % (CMI90) de la croissance bactérienne. La gentamycine a été utilisée comme contrôle positif.

5.2.2 ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE

L'activité antifongique a été mesurée en utilisant la méthode décrite par Fisher et Armstrong avec quelques modifications (Fisher et Armstrong 1977). Les levures *C. albicans* (ATCC 18804) ont été ensemencés dans des microplaques 96 puits à fond plat à une densité de 2×10^3 levures par puits dans un volume de 100 µl de bouillon Sabouraud dextrose (Difco). Des concentrations croissantes d'extraits allant de 1,56 à 200 µg/ml ont été ajoutées avec un volume de 100 µl par puits. Les microplaques ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. L'absorbance a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre Varioskan (Thermo, Labsystems) à une longueur d'onde de 540 nm. Les résultats sont exprimés en concentration minimale inhibant 90 % (CMI90) de la croissance fongique. L'amphotéricine B est utilisée comme contrôle positif.

5.3 RÉSULTATS

Les résultats, présentés dans le tableau 4, montrent que tous les extraits testés contre *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* sont inactifs à l'exception de l'extrait éthanolique de *H. lactifluorum* lequel possède une activité antibactérienne notable contre *S. aureus* avec des CMI respectives de 12,5 et 50 µg/ml après 6 et 24 heures d'exposition. À notre

connaissance, le potentiel antibactérien de *H. lactifluorum* n'avait jamais été rapporté dans la littérature auparavant.

Tableau 4 : Évaluation des activités antibactérienne et antifongique des extraits de champignons sur deux souches bactériennes (*E. coli*, *S. aureus*) et une souche de levures (*C. albicans*).

Champignon	Solvant d'extraction	CMI90 [$\mu\text{g/ml}$] ^a				
		6 heures		24 heures		<i>C. albicans</i>
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
<i>Boletus edulis</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Cantharellus cibarius</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Cortinarius caperatus</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200

a : Concentration minimale inhibitrice

Champignon	Solvant d'extraction	CMI90 [µg/ml]				
		6 heures		24 heures		C. <i>albicans</i>
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
<i>Craterallus fallax</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Craterellus tubaeformis</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II + NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Leccinum piceinum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Hydnum repandum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Hydnum umbilicatum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200

Champignon	Solvant d'extraction	CMI90 [µg/ml]				
		6 heures		24 heures		C. albicans
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
<i>Hypomyces lactifluorum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	12,5	≥ 200	50	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Morchella conica</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II + NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Ptychoverpa bohemica</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	n.d.	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH II	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Tricholoma matsutake</i>	Hexane	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Éthanol	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Eau	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Oxalate	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	NaOH	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
	Protéines	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
Contrôle						
Gentamycine		0,0195	< 0,005	0,039	< 0,0098	-
Amphotéricine B		-	-	-	-	0,18 µM

n.d. : Non déterminé

5.4 DISCUSSION

5.4.1 ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

D'après les résultats, seul l'extrait éthanolique de *H. lactifluorum* a démontré une activité détectable suivant les deux temps d'exposition. La littérature ne rapporte d'activité antibiotique pour ce champignon. Contrairement aux présents résultats, certains chercheurs font mention d'une activité antibactérienne pour quelques champignons à l'étude de ce projet. Pour *C. caperatus*, un article rapporte des propriétés antibactériennes d'un extrait au méthanol de champignons du genre *Cortinarius* contre plusieurs lignées bactériennes incluant *E. coli* et *S. aureus* (Ozen *et al.* 2011). Au moyen d'un test de disques imbibés de l'extrait placés dans un pétri, des zones d'inhibition avec des diamètres de $11,0 \pm 0,5$ mm et $10,0 \pm 0,5$ mm ont été générées contre *E. coli* et *S. aureus* respectivement. Dans le même article, un extrait au méthanol de *H. repandum* a induit des zones d'inhibition avec des diamètres de 11 ± 1 mm (*E. coli*) et $11,8 \pm 0,5$ mm (*S. aureus*). Une activité antibactérienne a également été rapportée pour *B. edulis* et *C. cibarius*, ce qui ne concorde pas à première vue avec les résultats obtenus (Ozen *et al.* 2011).

Cette différence peut être expliquée par le fait qu'il s'agit d'extractions différentes, ce qui amène à une composition chimique différente et une méthode d'analyse qui diffère de celle employée par les autres groupes de recherches. Ces derniers ont également tendance à employer des concentrations élevées dans l'ordre du mg. Pour ce qui est des autres espèces testées, aucune information dans la littérature ne fait état de la présence de composés antibactériens.

5.4.2 ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE

À notre connaissance, aucun article ne rapporte les propriétés antifongiques de la plupart des champignons étudiés, les exceptions étant *B. edulis*, *C. cibarius* et *H. repandum* ainsi que des espèces du genre *Cortinarius*. Toutefois, les présents résultats sont en contradiction avec la littérature puisqu'aucune activité antifongique n'a été observée suite aux essais. Selon un article, des extraits au méthanol de *C. cibarius*, *Cortinarius* sp. et *H. repandum* ont démontré une activité inhibitrice envers *C. albicans* tandis que *B. edulis* n'a eu aucune activité (Ozen *et al.* 2011). Le diamètre des zones d'inhibition induites par des disques imbibés des extraits ont été de 13 ± 1 mm (*C. cibarius*), 10 ± 0 mm (*Cortinarius* sp.) et $11,5 \pm 0,5$ mm (*H. repandum*). La concentration des disques était de 1,2 mg/disque. Cette divergence entre les résultats actuels et ceux des autres groupes de recherche peut être expliquée par les différences au niveau des procédés d'extraction et des méthodes d'analyses. En effet, la composition moléculaire des extraits de champignons peut fortement varier en fonction du solvant d'extraction employé. Par exemple, les molécules extraites avec l'éthanol comme solvant ne seront pas nécessairement les mêmes que si le solvant d'extraction avait été du méthanol.

CHAPITRE VI

ACTIVITÉS COSMÉCEUTIQUES

6.1 ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

6.1.1 INTRODUCTION

Le vieillissement de la peau est le résultat de plusieurs facteurs qui peuvent être d'origine intrinsèque et extrinsèque. Les facteurs intrinsèques se définissent comme le vieillissement naturel de la peau notamment des facteurs génétiques liés à l'ethnicité, le type de peau ainsi qu'à des facteurs hormonaux (Farage *et al.* 2008a). Les facteurs extrinsèques sont, quant à eux, d'origine environnementale. La pollution, le tabac, une nutrition mal équilibrée ou l'exposition aux rayons UV sont parmi les exemples de facteurs extrinsèques (McCullough et Kelly 2006). Le rayonnement UV, qui favorise le stress oxydatif, constitue la principale cause de vieillissement prématuré de la peau chez l'humain. Le stress oxydatif se produit lorsque l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS en anglais pour *reactive oxygen species*) surpasse la capacité antioxydante de l'organisme (Poljsak et Dahmane 2012). Les ROS comprennent essentiellement des radicaux libres comme le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) ou des métabolites tels que l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Thannickal et Fanburg 2000). Le corps humain produit naturellement des ROS par l'intermédiaire de l'oxygène qui agit en tant qu'accepteur d'électron de la part du cytochrome-c oxydase, dernière étape de la chaîne de transfert des électrons (Thannickal et Fanburg 2000). Le stress oxydatif peut induire des changements au niveau de la structure des lipides, des protéines et des acides nucléiques par la présence d' $\text{HO}\cdot$ (Wells *et al.* 2009). Il est également impliqué dans le développement de plusieurs pathologies telles que des maladies cardiovasculaires, des troubles neurologiques ainsi que plusieurs cancers pour ne citer que quelques exemples (Phaniendra, Jestadi et Periyasamy 2015). Au niveau de

la peau, le stress oxydatif peut provoquer de l'inflammation, de l'hyperpigmentation de la peau, la dégradation du collagène et de l'élastine par des protéases (ex : collagénase, élastase), la diminution de leur biosynthèse (Masaki 2010) ainsi que des dommages à l'ADN (Ueda et Shah 1992). La prévention du stress oxydatif implique principalement la recherche d'extraits ou de composés capables de neutraliser les ROS (« *scavenging* ») (Glasauer et Chandel 2014). D'autre part, les agents chélateurs de fer présentent également un intérêt dans la recherche d'antioxydants puisque le fer est impliqué dans la conversion du H_2O_2 et de l'O_2^- en $\text{HO}\cdot$ par la réaction de Fenton (Wright, Richards et Srai 2014).

6.1.2 MÉTHODOLOGIE

L'évaluation de l'activité antioxydante des champignons a été effectuée en employant deux tests, soient le test ORAC et un test cellulaire avec des fibroblastes de peau humaine, WS-1. La raison d'effectuer deux tests pour ce type d'activité est que le test ORAC ne couvre qu'une partie de l'ensemble des catégories de radicaux libres de l'oxygène pouvant être retrouvés dans l'organisme humain. De plus, le test ORAC permet d'obtenir des valeurs standards que l'on peut comparer avec la littérature. Le test sur cellules permet d'évaluer le caractère antioxydant des échantillons contre les radicaux hydroxyles. Cela permet ainsi une plus large gamme de détection des antioxydants possibles que le test ORAC permet. Notamment, les agents chélateurs de fer ne sont pas détectables avec le test ORAC, mais ils le sont par le test cellulaire.

Le test ORAC (*Oxygen Radical Absorption Capacity*) consiste à mesurer la capacité d'un échantillon à inhiber l'oxydation de la fluorescéine, un agent fluorescent. Il

s'agit d'un test purement chimique étant donné l'absence de cellules dans ce test. La méthode que nous avons utilisée est celle décrite dans une autre publication avec quelques modifications (Ou, Hampsch-Woodill et Prior 2001). Le test s'effectue dans des microplaques noires à 384 puits dans du tampon phosphate 75 mM à pH 7,4. Chaque extrait et contrôle positif (quercétine et trolox) a été préparé selon un gradient de 16 concentrations avec un facteur de dilution $\frac{1}{2}$. Chaque concentration a été dupliquée. La courbe standard de trolox a été préparée selon un gradient de quatre concentrations, chacune répliquée huit fois. Un volume de solution de *Fluorescein sodium salt* (Fl, Sigma-Aldrich F6377) à 75 nM a été ajouté dans tous les puits. La fluorescéine est déjà fluorescente et perd cette dite fluorescence une fois oxydée. Un volume de *2,2'-azobis(2-methyl-propionamidine) dihydrochloride* (AAPH, Sigma-Aldrich 440914) à 375 mM a également été ajouté à chaque puits. Ce réactif génère des radicaux peroxy ($\text{ROO}\cdot$) sous l'effet de la chaleur. Une fois tous les éléments dans la plaque, une cinétique de fluorescence (λ excitation : 485 nm, λ émission : 530 nm) a été effectuée avec l'aide du fluorimètre Fluoroskan décrit précédemment pendant une période d'une heure, avec une lecture à chaque minute. Les résultats sont exprimés en équivalents μmol de trolox/mg d'extrait.

Le test antioxydant cellulaire a été effectué tel que décrit par Girard et al avec quelques modifications (Girard-Lalancette, Pichette et Legault 2009). Des fibroblastes de peau humaine WS-1 (ATCC CRL-1502) ont étéensemencés en microplaques à 96 puits dans du milieu de culture décomplémenté selon une densité de 1×10^4 cellules par puits. Les fibroblastes sont ensuite incubés 24 heures à 37 °C et 5 % de CO_2 pour permettre leur adhésion. Les cellules sont incubées pendant deux heures avec une solution de 2',7'-

dichlorofluorescein-diacétate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich D6883) à 5 μM dans du HBSS. Initialement, la DCFH-DA n'est pas fluorescente, mais elle le devient après être oxydée. La DCFH-DA est absorbée par les cellules et ses deux groupements acétate sont clivés par les enzymes intracellulaires, empêchant ainsi la DCFH-DA devenue DCFH de sortir de la cellule. Suite à cela, les puits des plaques sont lavés et les cellules sont incubées ou non avec des concentrations croissantes d'extrait variant entre 0,2 et 100 $\mu\text{g/ml}$. Une heure et demie plus tard, une solution de *tert*-butyl hydroperoxide (tBH, Sigma-Aldrich 458139) à une concentration de 200 μM est ajoutée aux cellules afin d'induire un stress oxydatif. Le tBH favorise la génération de radicaux hydroxyles ($\text{HO}\cdot$) par des réactions de Fenton avec les traces de fer libre intracellulaire. Ces radicaux, en réagissant avec la DCFH, la convertissent en DCF et rendent maintenant la molécule fluorescente. L'activité antioxydante correspond, dans ce cas-ci, à la capacité à inhiber l'oxydation de la DCFH et empêcher l'augmentation de la fluorescence. Immédiatement après l'ajout du tBH, une première lecture de la fluorescence est effectuée (λ excitation : 485 nm, λ émission : 530 nm) avec un fluorimètre Fluoroskan Ascent FI. Une seconde lecture a été faite 3 heures plus tard. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'oxydation de la DCFH. La concentration inhibant de 50 % l'oxydation (IC_{50}) en $\mu\text{g/ml}$ a été déterminé à partir des courbes des résultats d'inhibition.

6.1.3 RÉSULTATS

Les résultats obtenus lors des tests ORAC et cellulaire sont présentés dans le tableau 5. Selon la méthode ORAC, les résultats montrent que les extraits de champignons comestibles sont faiblement antioxydants avec des valeurs ORAC variant entre 0,005 et 2 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. La valeur ORAC la plus élevée a été obtenue avec

l'extrait secondaire d'eau de *C. fallax* avec 2 ± 1 μmol Trolox/mg. Les résultats obtenus avec le test cellulaire, indiquent que plusieurs extraits possèdent un potentiel antioxydant intéressant avec des IC_{50} variant entre 2,6 et 77 $\mu\text{g/ml}$. L'extrait secondaire à l'eau de *L. piceinum* possède la plus forte activité antioxydante parmi tous les extraits testés avec un IC_{50} de $2,6 \pm 0,6$ $\mu\text{g/ml}$. Quatre autres extraits de ce champignon possèdent également une activité antioxydante notable, soient ceux à l'éthanol, l'eau (primaire et secondaire) ainsi que l'extrait de protéines. *G. sepiarium* possède aussi des propriétés antioxydantes intéressantes avec des IC_{50} de $3,9 \pm 0,9$ $\mu\text{g/ml}$ et $2,8 \pm 0,8$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement pour l'extrait hexane-éthanol et pour l'extrait secondaire à l'eau. De plus, l'extrait hexane-éthanol et l'extrait à l'eau de *P. cinnabarinus* possèdent une activité antioxydante intéressante avec des IC_{50} variant entre 3,4 et 13 $\mu\text{g/ml}$. D'autres champignons ont également été trouvés actifs notamment *B. edulis* avec ces extraits à l'eau ($\text{IC}_{50} = 50 \pm 2$ $\mu\text{g/ml}$) et de protéines ($\text{IC}_{50} = 55 \pm 4$ $\mu\text{g/ml}$), *C. fallax*, *G. frondosa*, *H. umbilicatum* et *M. conica*. D'autre part, plusieurs extraits présentent un caractère pro-oxydant, c'est-à-dire qu'ils ont induit une augmentation de l'oxydation au lieu de l'inhiber. Il s'agit principalement des extraits à l'oxalate d'ammonium ou à l'hydroxyde de sodium.

Tableau 5 : Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de champignons selon le test ORAC et le test sur cellules.

Champignon	Solvant d'extraction	Indice ORAC (µmol Trolox/mg)^a	IC₅₀ [µg/ml]^b
<i>Boletus edulis</i>	Hexane	≤ 0,005	≥ 100
	Éthanol	0,29 ± 0,04	50 ± 2
	Eau	0,03 ± *	≥ 100
	Oxalate	≤ 0,005	Pro-oxydant
	NaOH	0,02 ± 0,02	Pro-oxydant
	Eau II	0,54 ± 0,08	55 ± 4
	NaOH II	0,39 ± 0,03	≥ 100
	Protéines	0,21 ± 0,09	≥ 100
<i>Cantharellus cibarius</i>	Hexane	0,11 ± 0,02	≥ 100
	Éthanol	0,12 ± 0,02	≥ 100
	Eau	0,07 ± 0,01	≥ 100
	Oxalate	0,05 ± *	≥ 100
	NaOH	0,06 ± *	≥ 100
	Protéines	0,11 ± 0,03	≥ 100
<i>Cortinarius caperatus</i>	Hexane	0,02 ± *	≥ 100
	Éthanol	0,14 ± 0,02	≥ 100
	Eau	0,16 ± *	≥ 100
	Oxalate	≤ 0,005	Pro-oxydant
	NaOH	0,07 ± 0,02	≥ 100
	Eau II	0,08 ± *	≥ 100
	Protéines	0,17 ± 0,07	≥ 100
<i>Craterallus fallax</i>	Hexane	0,06 ± 0,01	≥ 100
	Éthanol	0,30 ± 0,03	68 ± 9
	Eau	0,61 ± 0,06	53 ± 9
	Oxalate	≤ 0,005	Pro-oxydant
	NaOH	0,06 ± 0,02	Pro-oxydant
	Eau II	2 ± 1	77 ± 9
	NaOH II	0,52 ± 0,05	≥ 100
	Protéines	0,30 ± 0,04	≥ 100

a : Équivalent en µmol de Trolox par mg d'extrait

b : Concentration inhibant 50 % de l'activité antioxydante (test cellulaire)

Les symboles « * » signifient que l'écart-type obtenu est inférieur à 0,01 µg/ml.

Champignon	Solvant d'extraction	Indice ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$)	IC ₅₀ [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Craterellus tubaeformis</i>	Hexane	0,03 \pm *	≥ 100
	Éthanol	0,28 \pm 0,07	80 \pm 6
	Eau	0,13 \pm *	≥ 100
	Oxalate	$\leq 0,005$	≥ 100
	NaOH	0,05 \pm *	≥ 100
	Eau II + NaOH II	0,42 \pm 0,03	≥ 100
	Protéines	0,17 \pm 0,04	≥ 100
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Hexane + Éthanol	n.d.	3,9 \pm 0,9
	Oxalate	n.d.	> 100
	Eau II	n.d.	2,8 \pm 0,8
<i>Grifola frondosa</i>	Hexane + Éthanol	n.d.	20 \pm 6 $\mu\text{g/ml}$
	Eau	n.d.	> 100
	Oxalate	n.d.	Pro-oxydant
<i>Hydnum repandum</i>	Hexane	0,03 \pm *	≥ 100
	Éthanol	0,02 \pm 0,01	≥ 100
	Eau	0,16 \pm 0,02	≥ 100
	Oxalate	$\leq 0,005$	Pro-oxydant
	NaOH	0,01 \pm *	≥ 100
	Eau II	0,08 \pm *	≥ 100
	NaOH II	0,4 \pm 0,1	≥ 100
	Protéines	0,21 \pm 0,05	≥ 100
<i>Hydnum umbilicatum</i>	Hexane	0,09 \pm 0,01	13 \pm 6
	Éthanol	0,1 \pm 0,01	≥ 100
	Eau	0,39 \pm 0,02	65 \pm 18
	Oxalate	$\leq 0,005$	Pro-oxydant
	NaOH	0,09 \pm 0,03	≥ 100
	Protéines	0,12 \pm 0,02	≥ 100
<i>Hypomyces lactifluorum</i>	Hexane	0,03 \pm *	≥ 100
	Éthanol	0,13 \pm 0,01	≥ 100
	Eau	$\leq 0,005$	≥ 100
	Oxalate	0,05 \pm *	≥ 100
	NaOH	0,02 \pm *	≥ 100
	NaOH II	0,5 \pm 0,1	≥ 100
	Protéines	0,21 \pm 0,09	≥ 100

n.d. : Non déterminé

Pro-oxydant : Augmentation du taux d'oxydation détectée

Champignon	Solvant d'extraction	Indice ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$)	IC ₅₀ [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Leccinum piceinum</i>	Hexane	0,07 \pm 0,01	≥ 100
	Éthanol	0,58 \pm 0,07	30 \pm 9
	Eau	0,39 \pm 0,04	24 \pm 4
	Oxalate	$\leq 0,005$	≥ 100
	NaOH	0,03 \pm 0,01	≥ 100
	Eau II	0,46 \pm 0,03	2,6 \pm 0,6
	NaOH II	0,8 \pm 0,2	≥ 100
	Protéines	0,45 \pm 0,08	66 \pm 9
<i>Morchella conica</i>	Hexane	0,02 \pm *	≥ 100
	Éthanol	0,38 \pm 0,05	37 \pm 13
	Eau	0,13 \pm 0,02	≥ 100
	Oxalate	$\leq 0,005$	≥ 100
	NaOH	0,04 \pm *	≥ 100
	Eau II + NaOH II	0,45 \pm 0,04	≥ 100
	Protéines	0,22 \pm 0,04	≥ 100
<i>Ptychoverpa bohemica</i>	Hexane	0,02 \pm *	≥ 100
	Éthanol	0,22 \pm 0,04	≥ 100
	Eau	0,19 \pm 0,02	≥ 100
	Oxalate	$\leq 0,005$	≥ 100
	NaOH	n.d.	n.d.
	Eau II	0,31 \pm 0,07	≥ 100
	NaOH II	0,48 \pm 0,08	≥ 100
	Protéines	0,38 \pm 0,04	≥ 100
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Hexane + Éthanol	n.d.	12 \pm 2
	Eau	n.d.	13 \pm 2
	Oxalate	n.d.	> 100
	Eau II	n.d.	3,4 \pm 0,7
<i>Tricholoma matsutake</i>	Hexane	0,08 \pm 0,01	≥ 100
	Éthanol	0,08 \pm 0,01	≥ 100
	Eau	0,09 \pm *	≥ 100
	Oxalate	0,05 \pm *	≥ 100
	NaOH	0,01 \pm *	≥ 100
	Protéines	0,08 \pm 0,01	≥ 100
Contrôle			
Quercétine		21 \pm 4	0,22 \pm 0,01
Trolox		-	0,023 \pm 0,005

6.1.4 DISCUSSION

Plusieurs espèces de champignons forestiers posséderaient des propriétés antioxydantes d'après les rapports de nombreuses équipes de recherche. Généralement, ce type d'activité est surtout associé à la teneur en composés phénoliques des champignons comme les acides phénoliques et les flavonoïdes (Ferreira, Barros et Abreu 2009). Les champignons peuvent également contenir des tocophérols, de l'acide ascorbique ainsi que des caroténoïdes qui sont reconnus pour avoir des propriétés antioxydantes (Elmastas *et al.* 2006).

La présence d'une activité antioxydante dans les extraits éthanolique et aqueux de *B. edulis* avait déjà été rapportée lors d'une étude antérieure (Tsai, Tsai et Mau 2007). Selon cette étude, ces extraits posséderaient la capacité d'inactiver les radicaux hydroxyles et de chélater de fer. De plus, des résultats positifs ont été obtenus avec le test radicalaire DPPH.

Le potentiel antioxydant de *G. sepiarium* avait aussi déjà été rapporté grâce à l'utilisation de test FRAP sur des extraits préparés avec une solution de HCl [2 M] (Sulkowska-Ziaja *et al.* 2012). Ce test permet essentiellement de mesurer la capacité à réduire directement les oxydants, ce que l'on appelle généralement la capacité réductrice (Benzie et Strain 1996). Dans le cas présent, il est possible que l'activité antioxydante observée avec les extraits de *G. sepiarium* soit due entre autres à la présence d'antioxydants réducteurs. Toutefois, d'autres tests seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'activité antioxydante de *G. sepiarium*.

G. frondosa est l'un des champignons les plus étudiés dans le domaine de la recherche scientifique, particulièrement en ce qui concerne les extraits de polysaccharides. En effet, plusieurs études rapportent que les polysaccharides extraits de *G. frondosa* sont une source d'antioxydants (Fan *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). Cependant, les résultats obtenus dans la présente étude indiquent que les polysaccharides extraits avec l'eau distillée sont inactifs. D'autre part, l'activité de l'extrait hexane/éthanol (c.-à-d. une combinaison des extraits d'hexane et d'éthanol) confirme les résultats obtenus par d'autres chercheurs (Yeh *et al.* 2011). Il est possible que la méthode d'extraction de polysaccharides utilisée au cours du projet ne soit pas tout à fait adaptée pour des polypores comme *G. frondosa*. En effet, les extractions effectuées sur les deux autres polypores testés (*G. sepiarium* et *P. cinnabarinus*) n'ont pas permis d'obtenir assez de matière pour faire les tests contrairement aux autres espèces de champignons. L'utilisation d'ultrasons pendant l'extraction à reflux pourrait aider à obtenir un meilleur rendement (Chen *et al.* 2012).

L'extrait à l'éthanol de *M. conica* est le seul extrait qui possède une activité antioxydante pour ce champignon. Un article portant sur les propriétés bioactives de *M. conica* rapporte la présence d'une activité similaire pour un extrait à l'éthanol (Turkoglu *et al.* 2006). D'après cet article, leur extrait à l'éthanol de *M. conica* a obtenu un résultat de 96,9 % d'inhibition des radicaux libres DPPH à une concentration de 160 µg/ml. Aucun article ne fait état du potentiel antioxydant des autres extraits de ce champignon.

Bien que *P. cinnabarinus* ait eu des résultats forts intéressants lors du test cellulaire, on est en droit à se demander si le caractère cytotoxique de ses extraits observé lors des tests anticancéreux (tableau 3) a eu une quelconque influence sur les résultats du

test antioxydant cellulaire (tableau 5). Cependant, l'IC₅₀ de la cytotoxicité des extraits actifs contre les fibroblastes de peau humaine est supérieure à l'IC₅₀ mesurée pour l'activité antioxydante (exemple de l'extrait à l'eau; 12 ± 2 µg/ml (antioxydant cellulaire) contre 31 ± 3 µg/ml (cytotoxicité)). Cette comparaison indiquerait que l'activité cytotoxique des extraits ne serait pas en cause pour expliquer la présence d'une activité antioxydante. D'après l'article de Dias et Urban en 2009, divers extraits de *P. cinnabarinus* ont été testés au moyen du test au radical DPPH à une concentration de 1 mg/ml. Cependant, les résultats obtenus démontraient une activité relativement faible contre les radicaux pour les extraits d'acétate d'éthyle (15,7 % d'activité), d'eau (13,0 % d'activité), de dichlorométhane (4,5 % d'activité) et de méthanol (9,5 % d'activité).

Plusieurs extraits de *C. fallax*, *C. tubaeformis*, *H. umbilicatum* et *L. picceinum* ont montré une activité antioxydante. L'extrait aqueux de *L. picceinum* est posséder la plus forte activité antioxydante. À notre connaissance, c'est la première fois qu'une activité antioxydante est rapportée pour ces espèces.

On constate que plusieurs des extraits actifs d'après les résultats du test cellulaire ne présentent pas d'activité antioxydante notable suite au test ORAC. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les deux méthodes d'analyse peuvent détecter chacun leur propre gamme d'oxydants. Tel qu'expliqué précédemment, le test cellulaire peut détecter les radicaux libres hydroxyles ainsi que les oxydants qui en dérivent. Le test ORAC, quant à lui, détecte plutôt les radicaux libres peroxydes, qui comptent parmi les oxydants pouvant dériver du radical libre hydroxyle. Suivant cette logique, les oxydants détectables par le test ORAC le sont également par le test cellulaire. Cependant, le test cellulaire détecte d'autres oxydants qui ne sont pas inclus dans le répertoire du test ORAC. Par

exemple, les agents chélateurs de fer qui agissent sur la réaction de Fenton, une réaction permettant la formation de radicaux hydroxyles, sont seulement détectables avec le test cellulaire. En ce qui concerne les résultats actuels, l'observation d'une activité antioxydante uniquement avec le test cellulaire signifierait que les agents antioxydants contenus dans les extraits actifs n'agissent pas particulièrement sur les radicaux peroxydes.

Concernant les activités dites « pro-oxydantes » détectées, on constate tout d'abord qu'il s'agit essentiellement d'extraits à l'oxalate d'ammonium ou à l'hydroxyde de sodium. Considérant le haut rendement observé pour ces extractions, il est fortement probable que ces extraits contiennent une quantité notable du soluté utilisé pour l'extraction (oxalate d'ammonium et hydroxyde de sodium). L'oxalate d'ammonium est utilisé notamment lors d'études sur les blessures rénales induites par un stress oxydatif puisque ce composé induit l'hyperoxalurie qui est une augmentation de l'excrétion d'oxalate par les voies urinaires (Rajeswari et Varalakshmi 2006; Bhasin, Urekli et Atta 2015). De plus, l'ion oxalate représente le principal composé retrouvé dans la formation des pierres rénales (Rajeswari et Varalakshmi 2006). En effet, l'ion oxalate perturbe l'intégrité de la membrane cellulaire par un stress oxydatif causé par des réactions de peroxydation, ce qui peut conduire à une augmentation de la perméabilité de la membrane (Kocic *et al.* 2001; Rajeswari et Varalakshmi 2006). Pour l'hydroxyde de sodium, il a été démontré que ce dernier, à une concentration de 150 mM, peut induire une augmentation de la production de l'anion O_2^- par une réduction du cytochrome *c* chez des cellules de la muqueuse gastrique (Bagchi *et al.* 1999). Il y a donc possibilité que ces solutés aient eu un effet oxydatif sur les fibroblastes ce qui est facilement vérifiable en

soumettant des solutions contenant ces solutés aux tests d'activité antioxydante. Il est nécessaire d'améliorer la méthode d'extraction aux solutions alcalines de sorte à séparer le plus possible les solutés des composés extraits des champignons. La dialyse pourrait faciliter la purification des composés extraits en les séparant des solutés d'extractions (oxalate d'ammonium et hydroxyde de sodium) selon leur taille (Chen *et al.* 2014a). Une autre solution suggérée, particulièrement pour les extraits à l'hydroxyde de sodium, est de neutraliser l'hydroxyde de sodium, qui est une base, par l'ajout d'un acide comme l'acide chlorhydrique (HCl) (Chen *et al.* 2014b). Puisque cette neutralisation chimique résulte en la formation d'un sel (dans le cas présent, du chlorure de sodium (NaCl)), il suffirait ensuite de séparer par centrifugation le sel de l'extrait neutralisé (Cui *et al.* 1999). Il ne resterait plus qu'à précipiter les composés extraits avec l'éthanol tel qu'indiqué dans la procédure initiale.

6.2 ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE

6.2.1 INTRODUCTION

Le corps humain possède des moyens de défense innés lui permettant de lutter contre les infections et d'éliminer les corps étrangers indésirables, que ce soit des virus, des bactéries ou même nos propres cellules endommagées. La réaction inflammatoire représente la première étape de la réponse immunitaire. La cytokine TNF (« tumor necrosis factor ») est sécrétée par les macrophages suite à la détection d'un pathogène ou d'une blessure dans une région donnée (Tracey 2002). La hausse de la production de cette cytokine induit l'apparition des premiers signes cliniques de l'inflammation tels que de la douleur, des rougeurs ainsi qu'une hausse de la chaleur dans la région enflée qui devient enflée (Tracey 2002). Bien qu'importantes pour la protection immunitaire de

l'organisme, les réactions inflammatoires peuvent toutefois causer des dommages si elles sont trop prononcées (Zhang et Falla 2009). Les dommages à la peau, par exemple, peuvent conduire à son vieillissement prématuré, ce qui peut amener son lot de complications. Pour ne citer que quelques exemples, cela peut amener une dégradation de la matrice extracellulaire de la peau, l'amincissement de l'épiderme, un ralentissement de la capacité de guérison ainsi que l'émergence de maladies de la peau comme le psoriasis (Farage *et al.* 2007; Farage *et al.* 2008b). Il a été reconnu que la présence des macrophages et leucocytes dans la région atteinte d'inflammation induit une hausse de la production de superoxyde et d'ions de fer catalytiques à partir de la ferritine (protéine de stockage du fer), pouvant ainsi causer des dommages structurels à la peau (Pillai, Oresajo et Hayward 2005). La dégradation de protéines structurales composant la matrice extracellulaire de la peau (ex : élastine, collagène) par des protéases comme l'élastase et la collagénase peut être induite par la présence de neutrophiles (Yaar et Gilchrest 2007; Bennett *et al.* 2008). Leur dégradation peut amener à une perte d'élasticité et de résistance de la peau, la rendant ainsi plus fragile. D'autre part, les macrophages produisent de l'oxyde nitrique (NO) en guise de réponse inflammatoire en utilisant la « nitric oxide synthase » (NOS) comme enzyme catalysant la réaction. L'action des macrophages stimule aussi la production de ROS (Forman et Torres 2001). Le peroxynitrite (ONOO⁻), produit de la réaction entre le NO et l'anion superoxyde, est un puissant oxydant pouvant maintenir l'action du facteur de transcription NF- κ B, ce dernier jouant un rôle majeur dans la régulation et le maintien de la réaction inflammatoire (Hattori, Kasai et Gross 2004; Korhonen *et al.* 2005). Il est donc important de développer de nouveaux traitements anti-inflammatoires topiques afin de contrer les effets

indésirables de l'inflammation, dont les dommages contre la peau. Les traitements anti-inflammatoires peuvent viser différents mécanismes tels que l'inhibition de la production de NO, l'expression des cytokines pro-inflammatoires ou en altérant certaines réactions causées par des facteurs de transcription comme NF- κ B.

6.2.2 MÉTHODOLOGIE

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée au moyen d'un test mesurant l'inhibition de la production de monoxyde d'azote (NO) précédemment publié avec quelques modifications (Legault *et al.* 2010). Les réactions inflammatoires *in vitro* génèrent des molécules de NO grâce à l'activité de l'« inducible nitrous oxide synthase » (iNOS), une enzyme connue du mécanisme anti-inflammatoire. Pour ce test, des macrophages (RAW 264.7, ATCC CRL-2278) ont étéensemencés dans des microplaques à 96 puits dans du milieu de culture complet décomplémenté à une densité de $7,5 \times 10^4$ cellules par puits. Après une nuit d'incubation à 37°C et 5 % de CO₂, les cellules sont traitées ou non avec des extraits, avec un gradient de concentrations variant entre 1,25 et 160 µg/ml. Le *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME, Sigma-Aldrich, L2630), un inhibiteur connu de l'iNOS, est utilisé en guise de contrôle positif à des concentrations de 250 µM et 1 mM. Suite à l'ajout des échantillons, 100 ng/ml de LPS (lipopolysaccharide) d'*E. coli* a été ajouté aux macrophages afin de stimuler la production de NO. Après une période d'incubation de 24 heures, le surnageant des puits a été retiré des plaques et 100 µl de ce surnageant a été transféré dans de nouvelles microplaques à 96 puits. À ces 100 µl de surnageant, 100 µl d'une solution de réactif de Griess ont été ajoutés pour doser la concentration de NO. Le réactif de Griess (naphthylethylenediamine dihydrochloride 0,2 % mélangé à du sulphanilamide 2 % dans

de l'acide phosphorique 5 %) est un indicateur qui change de coloration en fonction de la concentration de molécules de NO auquel il est exposé. Les microplaques contenant le réactif de Griess ont été incubées 15 minutes à température pièce et à l'abri de la lumière, puis elles ont été lues à partir d'un lecteur de plaques (Varioskan) à une longueur d'onde de 540 nm. Le pourcentage d'inhibition de la production de NO des cellules traitées avec les extraits ou non a été calculé. Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration inhibant 50 % de la production de NO (IC₅₀). La cytotoxicité des extraits a également été déterminée à l'aide du test de Hoechst décrit précédemment.

6.2.3 RÉSULTATS

Les résultats d'activité anti-inflammatoires sont indiqués dans le tableau 6. Tout d'abord, l'extrait ayant eu l'activité anti-inflammatoire la plus forte détectée a été celle de la combinaison des extraits hexane et éthanol de *P. cinnabarius* avec une IC₅₀ de $1,9 \pm 0,4$ µg/ml. Tous les autres extraits de ce champignon ont été actifs avec des valeurs d'environ 20 µg/ml. Les extraits hexane-éthanol de *G. frondosa* et de *G. sepiarium* ont été trouvés actifs avec des IC₅₀ respectives de 14 ± 7 µg/ml et 23 ± 7 µg/ml. À noter également les résultats obtenus pour les extraits hexane-éthanol de *H. repandum* avec des IC₅₀ d'environ 20 µg/ml et 49 ± 6 µg/ml. Les extraits à l'hexane et de protéines de *C. cibarius* ont aussi démontré une activité anti-inflammatoire avec des IC₅₀ respectives de 41 ± 5 µg/ml et 44 ± 7 µg/ml. Finalement, l'extrait à l'hexane de *T. magnivelare* a obtenu une IC₅₀ de 67 ± 6 µg/ml. La figure 19 présente une dose-réponse des principaux extraits de champignons actifs.

Tableau 6 : Évaluation de l'effet des extraits de champignons sur l'inhibition de la production de NO des macrophages RAW 264.7.

Champignon	Solvant d'extraction	IC₅₀ [µg/ml]^a
<i>Boletus edulis</i>	Hexane	≥ 160
	Éthanol	≥ 160
	Eau	≥ 160
	Eau II	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	NaOH II	≥ 160
	Protéines	≥ 160
<i>Cantharellus cibarius</i>	Hexane	41 ± 5
	Éthanol	107 ± 15
	Eau	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	Protéines	44 ± 7
<i>Cortinarius caperatus</i>	Hexane	50 ± 11
	Éthanol	≥ 160
	Eau	≥ 160
	Eau II	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	Protéines	≥ 160
<i>Craterallus fallax</i>	Hexane	≈ 40
	Éthanol	≥ 160
	Eau	≥ 160
	Eau II	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	NaOH II	≥ 160
	Protéines	≥ 160

a : Concentration inhibant 50 % de la production de NO en µg/ml

Champignon	Solvant d'extraction	IC ₅₀ [µg/ml] ^a
<i>Craterellus tubaeformis</i>	Hexane	≥ 160
	Éthanol	≥ 160
	Eau	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	Eau II + NaOH II	≥ 160
	Protéines	≥ 160
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Hexane + Éthanol	23 ± 7
	Oxalate	≥ 160
	Eau II	≥ 160
<i>Grifola frondosa</i>	Hexane + Éthanol	14 ± 7
	Eau	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
<i>Hydnum repandum</i>	Hexane	≈ 20
	Éthanol	49 ± 6
	Eau	≥ 160
	Eau II	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	NaOH II	≥ 160
	Protéines	123 ± 28
<i>Hydnum umbilicatum</i>	Hexane	≈ 40
	Éthanol	140 ± 21
	Eau	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	Protéines	≥ 160
<i>Hypomyces lactifluorum</i>	Hexane	77 ± 32
	Éthanol	≥ 160
	Eau	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	NaOH II	≥ 160
	Protéines	≥ 160

Champignon	Solvant d'extraction	IC ₅₀ [µg/ml]
<i>Leccinum piceinum</i>	Hexane	≥ 160
	Éthanol	≥ 160
	Eau	≥ 160
	Eau II	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	NaOH II	≥ 160
	Protéines	≥ 160
<i>Morchella conica</i>	Hexane	≥ 160
	Éthanol	≥ 160
	Eau	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	Eau II + NaOH II	≥ 160
	Protéines	≥ 160
<i>Ptychoverpa bohemica</i>	Hexane	≥ 160
	Éthanol	≥ 160
	Eau	≥ 160
	Eau II	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	n.d.
	NaOH II	≥ 160
	Protéines	≥ 160
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Hexane + Éthanol	1,9 ± 0,4
	Eau	19,2 ± 0,5
	Eau II	21 ± 1
	Oxalate	22 ± 5
<i>Tricholoma magnivelare</i>	Hexane	67 ± 6
	Éthanol	≥ 160
	Eau	≥ 160
	Oxalate	≥ 160
	NaOH	≥ 160
	Protéines	≥ 160
Contrôle	Concentration (mM)	Inhibition (%)
L-name	1	75,9
	0,25	28,9

n.d. : Non déterminé

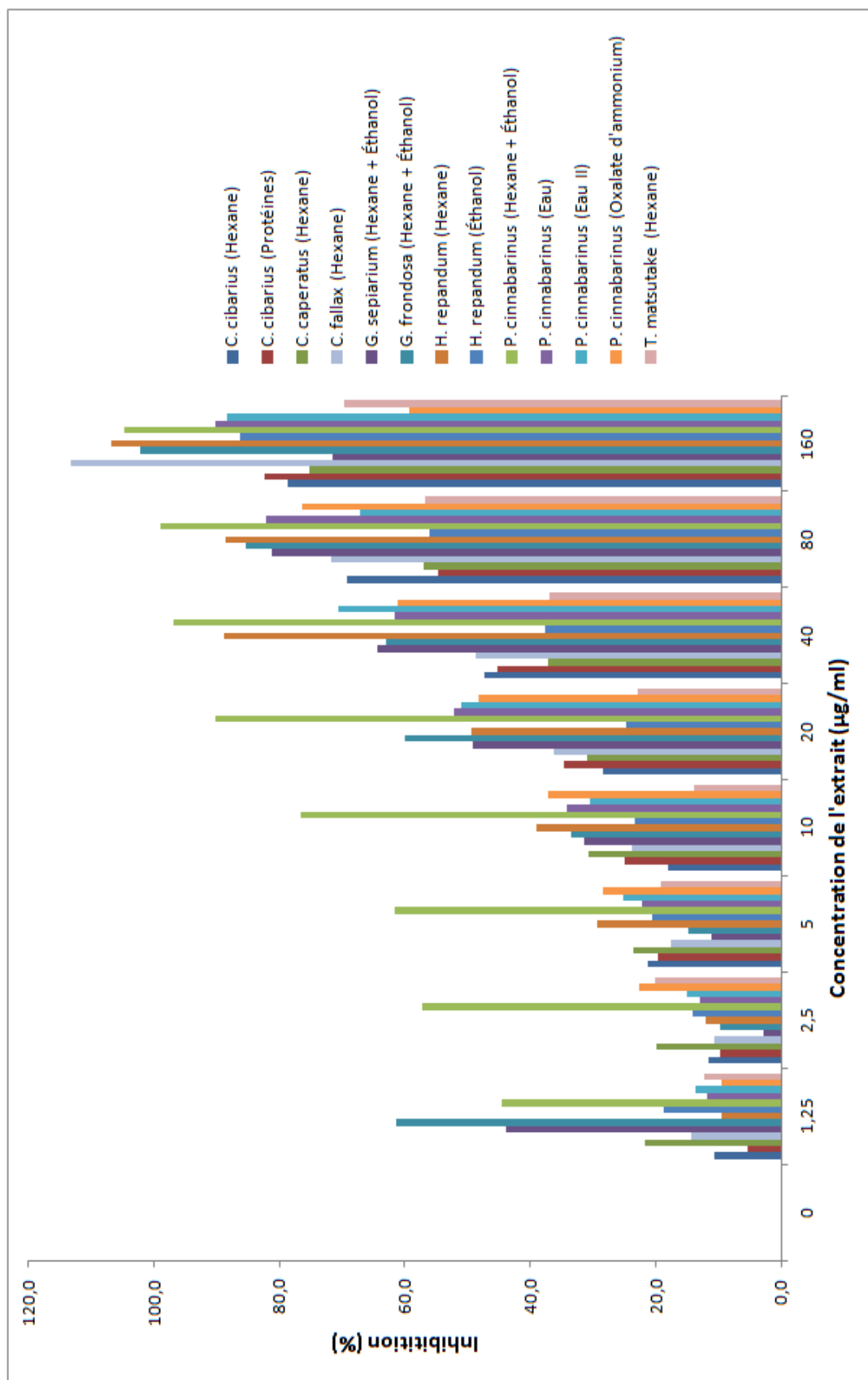


Figure 19 : Dose-réponse de plusieurs extraits de champignons actifs lors de l'évaluation de l'effet des extraits de champignons sur l'inhibition de la production de NO des macrophages RAW 264.7.

6.2.4 DISCUSSION

Les meilleurs résultats anti-inflammatoires ont été obtenus avec *P. cinnabarinus*. Il a été rapporté précédemment que des extraits à l'acétate d'éthyle, au dichlorométhane et au méthanol de *P. cinnabarinus* inhibaient la production des cytokines pro-inflammatoires leucotriène B₄ (LTB₄) et de ses isomères (Dias et Urban 2009). Toutefois, les composés responsables de cette activité n'ont pas été identifiés.

Plusieurs autres extraits de champignons ont présenté des activités anti-inflammatoires intéressantes, notamment, les extraits hexane, éthanol et de protéines de *C. cibarius*. L'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique a été rapportée dans une étude antérieure (Vamanu et Nita 2014). Selon cette étude, un extrait à l'éthanol à une concentration de 10 mg/ml a permis d'inhiber la dénaturation d'albumines à 88 ± 2 % suivi de près par un extrait au méthanol avec 86 ± 2 % d'inhibition. Les ROS générés par l'inflammation endommagent les composantes organiques tels que les lipides, les acides nucléiques ainsi que les protéines comme les albumines. Une protection contre la dénaturation des protéines s'avère d'intérêt pour un effet anti-inflammatoire. Il n'existe aucune référence dans la littérature ouverte concernant l'activité anti-inflammatoire des protéines de *C. cibarius*.

Les métabolites secondaires extraits de *G. frondosa* ont démontré une activité anti-inflammatoire. Des propriétés anti-inflammatoires ont déjà été observées par une autre équipe de chercheurs selon leurs résultats (Han et Cui 2012). Afin d'évaluer son potentiel anti-inflammatoire, un extrait d'agaricoglycérides a été administré quotidiennement à une dose de 500 mg/kg chez des rats affectés par une uvéite induite

par une injection de 200 µg/ml de LPS d'*E. coli*. Cet extrait a réussi à réduire l'expression de protéines inflammatoires comme iNOS, ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule-1 ») et COX-2 (« cyclooxygenase-2 ») ainsi qu'à inhiber l'activation de la NF-κB. En effectuant un examen de la composition chimique de l'extrait d'hexane et d'éthanol, il serait possible de déterminer si ce dernier contiendrait le même type de métabolites secondaires que ceux testés par Han et Cui en 2012.

En ce qui concerne *C. caperatus*, *C. fallax*, *G. sepiarium*, *H. repandum*, *H. umbilicatum*, *H. lactifluorum* et *T. magnivelare*, il s'agit de la première fois, à notre connaissance, qu'une activité anti-inflammatoire est rapportée pour ces espèces. Les résultats de cette étude contribuent à améliorer les connaissances actuelles sur les propriétés biologiques de ces champignons. Il s'agit cependant de tests préliminaires dans le cas présent, ce qui demande des recherches plus poussées dans le but de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de l'activité anti-inflammatoire observée. Les extraits actifs seront testés, au moyen de tests ELISA, pour évaluer leur effet sur les cytokines inflammatoires comme IL-1β, IL-6 et TNFα.

Il est à noter que l'inhibition de la production de NO, détectée par le test anti-inflammatoire, peut induire indirectement un effet antioxydant. La raison est que le NO peut générer la formation de ROS en réagissant avec d'autres molécules. Par exemple, le NO et l'anion O₂⁻ forment ensemble une molécule de peroxynitrite (ONOO⁻). À la suite d'une protonation et d'une scission homolytique, cette dernière peut former des radicaux hydroxyles (OH•) ainsi que du dioxyde d'azote (NO₂•) (Rochette *et al.* 2013). Lorsqu'un extrait présente à la fois des activités antioxydante et anti-inflammatoire, il est possible

que l'activité anti-inflammatoire soit responsable, du moins partiellement, de l'activité antioxydante détectée.

6.3 INHIBITION DE LA COLLAGÉNASE, DE L'ÉLASTASE ET DE LA TYROSINASE

6.3.1 INTRODUCTION

L'intégralité structurale de la peau est maintenue par la présence de protéines dans la matrice extracellulaire. Les protéines les plus présentes dans cette matrice sont le collagène et l'élastine (Hussain, Limthongkul et Humphreys 2013). Elles suscitent l'intérêt en recherche cosméceutique étant donné leur importance dans le maintien des fonctions de la peau. Le collagène joue plusieurs rôles selon le type. Les fibres de collagène les plus abondantes dans le derme sont les types I et III. Celles-ci confèrent à la peau une résistance aux forces de tension et permettent le maintien de sa structure. Le collagène de type IV est l'une des composantes majeures de la membrane basale qui sépare le derme de l'épiderme alors que le collagène de type VII a pour fonction d'assurer la jonction entre le derme et l'épiderme par ses fibrilles perpendiculaires faisant office d'ancrage (Naylor, Watson et Sherratt 2011). L'élastine est une protéine insoluble qui confère à la peau ses capacités extensibles (Baldwin *et al.* 2013).

Le vieillissement extrinsèque, principalement causé par les rayons UV, peut avoir des effets néfastes sur ces deux protéines structurales. Une surexposition au soleil entraîne une baisse de l'activité des TGF (« *transforming growth factor* » en anglais) et une hausse du facteur de transcription AP-1 induit par l'augmentation des ROS (Helfrich, Sachs et Voorhees 2008). La diminution de l'expression des TGF aura pour conséquence de réduire la production de procollagène. Un accroissement de l'activité d'AP-1 aura

comme effet d'augmenter la production des métalloprotéinases matricielles (MMP) qui dégradent le collagène. D'autre part, les réactions inflammatoires induites par la radiation solaire favorisent la production d'élastases par les macrophages, les neutrophiles et les fibroblastes lesquelles dégraderont les molécules d'élastine (Kammeyer et Luiten 2015). Certaines MMPs produites par le stress oxydatif s'attaquent non seulement au collagène, mais également à l'élastine comme la MMP-2. De plus, les ROS peuvent également désactiver des inhibiteurs tissulaires de MMP (TIMP) (Scharffetter-Kochanek *et al.* 2000). Les TIMP sont capables de protéger les protéines structurales du derme. Leur stimulation est donc une cible de choix dans la recherche de nouveaux produits cosméceutiques. Dans le cadre de ce projet, l'effet des extraits de champignons sur les enzymes dégradant le collagène et l'élastine comme la collagénase et l'élastase, a été évalué.

La tyrosinase est une glycoprotéine transmembranaire retrouvée chez les mélanosomes contenues dans les mélanocytes. Elle catalyse la formation de la L-DOPA à partir de L-tyrosine comme substrat (Videira, Moura et Magina 2013). Cette réaction constitue la première étape de la mélanogénèse, soit le processus de formation des mélanines s'effectuant chez les mélanocytes retrouvés dans l'épiderme (Chang 2009). Les mélanines sont les pigments donnant la teinte visible de la peau humaine. Elles sont classées en deux types : l'eumélanine confère la pigmentation noire et brune à la peau tandis que la phéomélanine donne le rouge et le jaune (Sturm, Box et Ramsay 1998). L'inhibition de la tyrosinase est l'un des champs d'intérêts majeurs du domaine cosméceutique pour le développement d'agent blanchissants. Ces produits, servant à diminuer la couleur de la peau, trouvent leur utilité pour traiter des cas

d'hyperpigmentation. L'hyperpigmentation consiste généralement en une répartition irrégulière des mélanines dans la peau des patients et peut causer des problèmes d'ordre esthétique. Les tâches de vieillesse, les mélasmes ainsi que les taches de rousseur sont des cas typiques d'hyperpigmentation (Solano *et al.* 2006). Certaines mutations induisent également une hyperpigmentation chez l'être humain comme l'anémie de Fanconi ou la déficience de vitamine B12 (Speeckaert *et al.* 2014).

6.3.2 MÉTHODOLOGIE (ANTI-COLLAGÉNASE)

L'évaluation de l'effet des extraits sur l'inhibition de la collagénase a été effectuée au moyen de l'essai « EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit » (Molecular Probes). Essentiellement, ce test consiste à mesurer par fluorimétrie l'activité de la collagénase sur un substrat de collagène conjugué à un marqueur fluorescent. La 1,10-phenanthroline monohydrate (Sigma, 320056) a été utilisée comme contrôle positif. Tout d'abord, les extraits de champignons (25, 50, 75 et 100 µg/ml) et le contrôle positif (18 µg/ml) ont été déposés dans une microplaque à 96 puits avec un volume de 80 µl par puits. Les échantillons ont été dilués dans du tampon de réaction (Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M, CaCl₂ 50 mM et azoture de sodium 2 mM; pH 7.6). Ensuite, 20 µl d'une solution de collagène de type 1 conjugué à la fluoresceine (Molecular Probes, D-12060) a été ajouté dans chaque puits. La collagénase de *Clostridium* (Sigma, C0130) a été diluée dans le tampon de réaction pour obtenir une concentration finale de 0,1 U/ml. Un volume de 100 µl de la dilution d'enzyme a été ajouté à chaque extrait et le contrôle positif. Le tampon de réaction seul a également été ajouté en guise de blanc (100 µl). Par la suite, les plaques ont été incubées à température pièce et à l'abri de la lumière afin de protéger la fluoresceine. Finalement, la fluorescence a été mesurée au moyen d'un fluorimètre

Varioskan (λ excitation : 495 nm, λ émission : 515 nm). L'activité est mesurée en pourcentage d'inhibition.

6.3.3 MÉTHODOLOGIE (ANTI-ÉLASTASE)

L'évaluation de l'effet des extraits sur l'inhibition de l'élastase a été effectuée à partir de la spectrophotométrie en utilisant l'élastase pancréatique porcine et le N-Succ-(Ala) 3-p-nitroanilide (Sigma, S4760) en tant que substrat. Dans des microplaques à 96 puits, des concentrations croissantes d'extraits variant de 62,5 à 500 $\mu\text{g/ml}$ (50 μl par puits) ont été préincubées pendant 15 minutes à 25 °C avec 75 μl d'élastase (3,33 $\mu\text{g/ml}$). Le substrat a été dilué dans un tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8) pour obtenir une concentration finale de 1,6 mM. Chaque extrait est accompagné d'un blanc constitué de tous les éléments excepté l'élastase. L'acide oléanolique est utilisé en tant que contrôle positif (concentration stock : 2 mg/ml; concentration finale : 100 $\mu\text{g/ml}$). Par la suite, la plaque a été incubée durant une période de 10 à 20 minutes à température ambiante. Après l'incubation, 125 μl de substrat ont été ajoutés dans tous les puits. Finalement, une lecture de l'absorbance a été effectuée sur une période de 20 minutes à 410 nm avec l'aide du spectrophotomètre automatisé Varioskan. Les concentrations finales testées pour les extraits sont les suivantes : 12,5, 25, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats sont exprimés selon la concentration inhibant de 50 % l'activité enzymatique de l'élastase (IC_{50}). Le pourcentage d'inhibition de l'élastase a été déterminé au moyen du calcul suivant :

$$\% \text{ Inhibition de l'élastase} = \{1 - (B/A)\} \times 100 \%$$

« A » étant l'absorbance du contrôle solvant et « B » pour l'absorbance de l'extrait ou du contrôle moins l'absorbance de son blanc.

6.3.4 MÉTHODOLOGIE (ANTI-TYROSINASE)

L'effet des extraits sur l'inhibition de la tyrosinase a été déterminé à partir d'une méthode basée sur la spectrophotométrie. Le substrat utilisé est un procédé dopachrome modifié avec de la L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine, Sigma #D9628). Ce substrat est nécessaire pour la formation d'eumélanine par la tyrosinase. Brièvement, une masse de 5 mg d'extrait a été pesée et dissoute dans 2 ml de DMSO. Dans une microplaque à 96 puits, un volume de 40 µl d'échantillon a été ajouté à 80 µl de tampon phosphate 0,1 M (pH 6,8), 40 µl de tyrosinase (Sigma, #T3428, 0,02 mg/ml) et 40 µl de L-DOPA (2,5 mM). Chaque échantillon est accompagné d'un blanc comprenant tous les composants excepté le L-DOPA. Les concentrations testées pour les extraits varient entre 75 et 600 µg/ml. Le contrôle négatif consiste en un blanc contenant seulement du DMSO. La quercétine est utilisée en tant que contrôle positif. Une fois les produits ajoutés, les extraits sont incubés pendant 30 minutes à 37°C. Après cette période d'incubation, l'absorbance est mesurée pendant une période de 30 minutes à 475 nm avec le spectrophotomètre automatisé Varioskan. Les résultats sont exprimés selon la concentration inhibant de 50 % l'activité enzymatique de la tyrosinase (IC₅₀). Le pourcentage d'inhibition de la tyrosinase a été calculé comme suit :

$$\% \text{ Inhibition de la tyrosinase} = ((A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}})/A_{\text{contrôle}}) \times 100 \%$$

« A_{contrôle} » correspondant à l'absorbance du contrôle négatif (avec le DMSO seulement)

et « A_{extrait} » représentant l'absorbance de l'extrait ou du contrôle positif (quercétine).

6.3.5 RÉSULTATS

Les résultats présentés dans le tableau 7 démontrent que les extraits de champignon comestible ne possèdent pas la capacité d'inhiber les enzymes étudiées de façon notable aux concentrations testées. Certaines données sont manquantes à cause d'un manque d'extrait disponible ou d'une incapacité à solubiliser les extraits dans le solvant utilisé (DMSO).

Tableau 7 : Évaluation de l'activité anti-collagénase, anti-élastase et anti-tyrosinase des extraits de champignons (IC₅₀).

Champignon	Solvant d'extraction	IC ₅₀ [µg/ml] ^a		
		Collagénase	Élastase	Tyrosinase
<i>Boletus edulis</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Oxalate	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600
<i>Cantharellus cibarius</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	n.d.	n.d.	≥ 600
	Oxalate	n.d.	n.d.	≥ 600
	NaOH	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600

a : Concentration inhibant 50 % de l'activité enzymatique

n.d. : Non déterminé

Champignon	Solvant d'extraction	IC ₅₀ [µg/ml]		
		Collagénase	Élastase	Tyrosinase
<i>Cortinarius caperatus</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Oxalate	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600
<i>Craterallus fallax</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Oxalate	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600
<i>Craterellus tubaeformis</i>	Hexane	n.d.	n.d.	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Oxalate	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau II + NaOH II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600
<i>Hydnum repandum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	n.d.	n.d.	≥ 600
	Eau II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Oxalate	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600

Champignon	Solvant d'extraction	IC ₅₀ [µg/ml]		
		Collagénase	Élastase	Tyrosinase
<i>Hydnum umbilicatum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	n.d.	n.d.	≥ 600
	Oxalate	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600
<i>Hypomyces lactifluorum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Oxalate	n.d.	n.d.	≥ 600
	NaOH	n.d.	n.d.	≥ 600
	NaOH II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600
<i>Leccinum piceinum</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Oxalate	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600
<i>Morchella conica</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Oxalate	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH	n.d.	n.d.	≥ 600
	Eau II + NaOH II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600

Contrôle	Concentration (µM)	Inhibition (%)		
		Collagénase	Élastase	Tyrosinase
<i>Ptychoverpa bohemica</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Oxalate	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	NaOH	n.d.	n.d.	≥ 600
	NaOH II	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600
<i>Tricholoma magnivelare</i>	Hexane	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Éthanol	≥ 200	≥ 100	≥ 600
	Eau	n.d.	n.d.	≥ 600
	Oxalate	n.d.	n.d.	≥ 600
	NaOH	n.d.	n.d.	≥ 600
	Protéines	≥ 200	≥ 100	≥ 600
Contrôle	Concentration (µM)	Inhibition (%)		
1,10-phenanthroline	500	103 ± 3	n.d.	n.d.
	250	97 ± 8	n.d.	n.d.
	100	69 ± 3	n.d.	n.d.
	50	17,9 ± 0,2	n.d.	n.d.
Acide oléanolique	100	n.d.	40 ± 2	n.d.
	50	n.d.	48 ± 2	n.d.
	25	n.d.	42 ± 3	n.d.
	12,5	n.d.	24 ± 5	n.d.
Quercétine	600	n.d.	n.d.	91 ± 2
	300	n.d.	n.d.	63 ± 4
	150	n.d.	n.d.	30 ± 2
	75	n.d.	n.d.	15 ± 2

6.3.6 DISCUSSION

Aucune étude ne rapporte le potentiel (ou l'absence de celui-ci) bioactifs des espèces testées pour inhiber l'activité enzymatique de la collagénase, de l'élastase et de la tyrosinase. Bien qu'il ne soit pas possible de comparer les résultats avec des références,

cela nous démontre toutefois que les extraits testés ne sont pas des sources intéressantes d'agents inhibiteurs.

6.4 STIMULATION DE LA CROISSANCE DES FIBROBLASTES

6.4.1 INTRODUCTION

Les fibroblastes sont l'un des types cellulaires majeurs de la structure cutanée, retrouvés principalement dans le derme. Ils contribuent à la formation et l'arrangement de la matrice extracellulaire ainsi qu'à la régulation de la physiologie de la peau (Makpol *et al.* 2011). Ils synthétisent notamment des protéines comme le collagène et l'élastine et à mesure que la peau vieillit, leur efficacité s'en retrouve diminuée. Dus à leur importance dans le maintien de l'intégrité structurale de la peau, les fibroblastes représentent une cible d'intérêt pour le développement d'ingrédients cosméceutiques, notamment en stimulant leur croissance.

6.4.2 MÉTHODOLOGIE

Afin d'évaluer la capacité des extraits à stimuler la croissance des fibroblastes, un dosage de l'ADN a été effectué. Des microplaques à 96 puits ont étéensemencées de fibroblastes de peau humaine (WS-1) selon une densité de 5×10^3 cellules par puits dans du milieu de culture décomplémenté. Après 24 heures d'incubation à 37°C et 5 % de CO₂, les cellules ont été traitées ou non avec des extraits selon des concentrations variant entre 1,56 et 200 µg/ml. Les cellules ont ensuite été incubées à nouveau pendant 24 heures et lysées par la suite afin de libérer leur ADN afin de le doser à l'aide du Hoechst. Des analyses statistiques ont été effectuées afin de déterminer s'il y a eu une augmentation signification de la quantité d'ADN selon une augmentation de la concentration d'extrait

utilisée. Les analyses statistiques ont été effectuées à partir du programme SigmaStat de Systat Software, Inc (version 3.5.0.54). Un test ANOVA à un facteur a été utilisé pour chaque ensemble de données étudiées. Des comparaisons multiples par paires ont été faites à partir du test Holm-Sidak afin de vérifier s'il y a une augmentation significative du taux de survie des fibroblastes. Essentiellement, cela signifie que chaque concentration a été comparée avec la concentration contrôle (concentration nulle d'extrait) afin de vérifier s'il y a eu bel et bien une augmentation significative de la quantité d'AD, et par le fait même, stimulation de la croissance des fibroblastes.

6.4.3 RÉSULTATS

La figure 20 présente les extraits ayant stimulé la croissance des WS-1 selon le test d'Hoescht. Trois extraits provenant de trois champignons différents se sont démarqués : *B. edulis* (NaOH), *C. fallax* (NaOH) et *M. conica* (eau). La plus forte augmentation de la croissance a été observée chez *M. conica* avec son extrait aqueux avec moyennes maximales de croissance de 175 ± 7 %. Une augmentation significative de la croissance est observable pour les trois extraits à partir de 3,125 µg/ml pour *B. edulis*, 12,5 µg/ml pour *C. fallax* et 50 µg/ml pour *M. conica*.

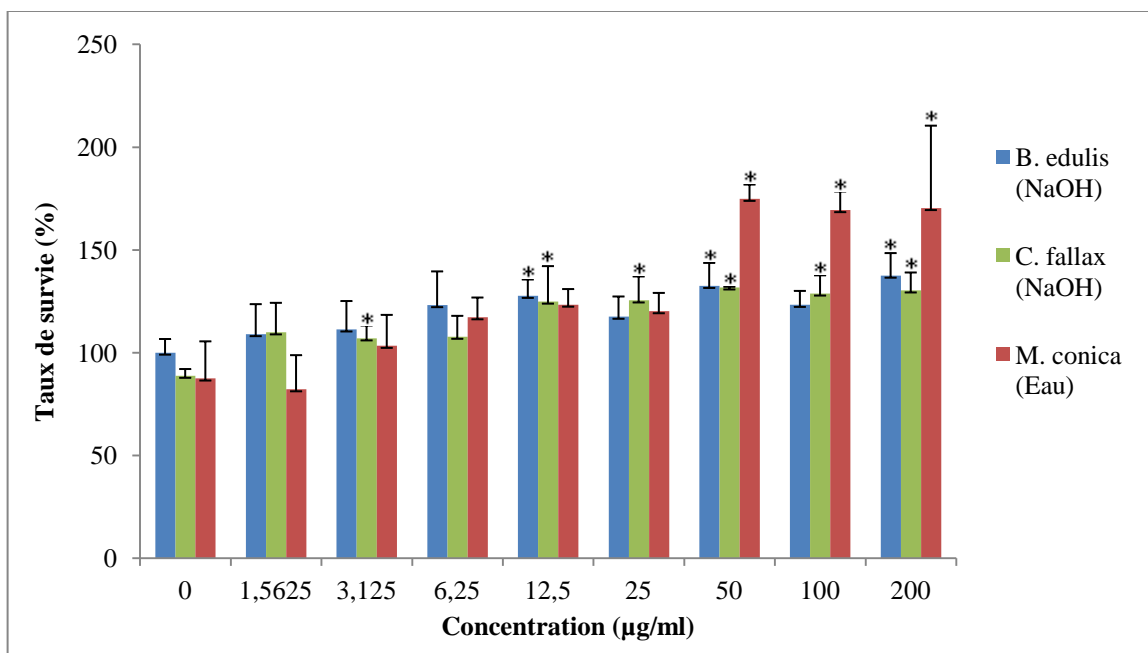


Figure 20 : Effet des extraits sur la stimulation de la croissance des fibroblastes.

Les symboles « * » indiquent que la valeur associée est significativement différente ($p < 0,05$) de la valeur contrôle (0 µg/ml) à partir du test de comparaisons multiples Holm-Sidak.

6.4.4 DISCUSSION

D'après les résultats du test de Hoechst (figure 20), les trois extraits présentés (*B. edulis* (NaOH), *C. fallax* (NaOH) et *M. conica* (eau)) ont induit significativement une augmentation de la croissance des fibroblastes comparativement aux cellules non traitées. La littérature scientifique actuelle ne rapporte pas de telles activités pour ces extraits. Ceux-ci s'avèrent intéressants pour des études plus approfondies sur ce type d'activité.

CHAPITRE VII

CONCLUSION

L'objectif principal de ce projet consistait à identifier, parmi quinze espèces de champignons de la forêt boréale, lesquelles présentaient un intérêt pour des applications cosméceutiques et pharmacologiques. Des extraits de ces champignons ont été préparés à l'aide de différentes méthodes afin d'isoler les métabolites secondaires, les polysaccharides et les protéines. Des rendements variables ont été obtenus selon le solvant d'extraction utilisé. Par exemple, le rendement total des extraits à l'hexane et à l'éthanol pour chaque champignon se situe dans les alentours de 10 %. Pour *H. repandum*, ce rendement total a même atteint une valeur de 19 %. Du côté des extractions à l'eau, les rendements pour l'ensemble des champignons se retrouvent généralement avec des valeurs de quelques pourcents, variant entre 0,1 et 8,6 %. L'extraction à l'eau de *M. conica* a obtenu toutefois un rendement relativement haut de 13 %. Le potentiel anticancéreux, antibactérien et antifongique des champignons a été évalué. Trois espèces ont présenté des propriétés anticancéreuses : *G. frondosa*, *G. sepiarium* et surtout *P. cinnabarinus* (extrait hexane/éthanol). Le seul champignon ayant présenté une activité antibactérienne contre *S. aureus* est *H. lactifluorum* avec son extrait éthanolique et aucun champignon n'a eu d'effet antifongique. Le potentiel antioxydant et anti-inflammatoire des champignons a été également à l'étude. Leur effet a également été testé sur des enzymes impliquées dans le vieillissement de la peau (collagénase, élastase, tyrosinase). Les résultats démontrent que tous les extraits testés n'inhibent pas la collagénase, l'élastase ou la tyrosinase. Toutefois, certaines espèces sont intéressantes pour leur potentiel antioxydant, soient *G. frondosa*, *G. sepiarium*, *H. umbilicatum*, *L. piceinum* et *P. cinnabarinus*. La plus forte activité antioxydante a été observée avec l'extraction secondaire à l'eau (Eau II) de *L. piceinum*, suivit de près par *P. cinnabarinus* et sa

combinaison des extraits à l'hexane et à l'éthanol. De plus, six des espèces étudiées possèdent une activité anti-inflammatoire, soient *C. cibarius*, *G. frondosa*, *G. sepiarium*, *H. repandum*, *H. umbilicatum* et *P. cinnabarinus*. Ce dernier a obtenu la meilleure activité anti-inflammatoire pour l'ensemble des champignons avec plusieurs de ses extraits (particulièrement l'extrait hexane/éthanol). L'effet des extraits sur la stimulation de la croissance de fibroblastes de peau humaine a également été évalué. Trois espèces ont augmenté la croissance des fibroblastes : *B. edulis* (extrait au NaOH), *C. fallax* (extrait au NaOH), et particulièrement *M. conical* (extrait à l'eau).

Maintenant que nous avons une idée du potentiel bioactif de ces champignons, il est possible de déterminer lesquels méritent d'être étudiés plus en détail (par exemple, *P. cinnabarinus*). Conséquemment, il faut isoler par fractionnement les composés actifs des champignons ayant présenté une activité notable. Une fois ces composés isolés, il sera possible de déterminer leur potentiel en tant qu'agents actifs et également d'étudier leurs mécanismes d'action au moyen d'une batterie de tests plus élaborée. Par exemple, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire ne se focalisait que sur l'inhibition de la production de NO. Il est possible d'étudier cette activité sous d'autres angles tels que la production de cytokines et de prostaglandines. L'utilisation d'un modèle *in vivo* constituerait également un atout. En matière de recherche cosméceutique, un modèle de peau humaine 3D permettrait d'observer les propriétés biologiques de composés actifs dans un contexte se rapprochant de la réalité. Un modèle comprenant un assortiment de cellules comme les kératinocytes, les fibroblastes, les mélanocytes et les cellules de Langerhans représenterait l'idéal dans le domaine de la recherche cosméceutique. Une autre voie à explorer est l'effet que les champignons pourraient avoir sur la production de

collagène, d'élastine ainsi que de la filaggrine et l'involucrine, deux autres protéines importantes de la peau humaine. Être en mesure d'étudier la capacité des cellules de la peau à se régénérer après une lésion, la protection contre les rayons UV ou même le pouvoir d'hydratation constitueraient aussi des apports considérables dans notre gamme de tests cosméceutiques au laboratoire.

CHAPITRE VIII

BIBLIOGRAPHIE

Andreu G et Vidal T. 2013. Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* and phenolic compounds: can the efficiency of an enzyme mediator for delignifying kenaf pulp be predicted? *Bioresour Technol*, 131 : 536-540.

Bagchi D, McGinn TR, Ye X, Balmoori J, Bagchi M, Stohs SJ, Kuszynski CA, Carryl OR et Mitra S. 1999. Mechanism of gastroprotection by bismuth subsalicylate against chemically induced oxidative stress in cultured human gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci*, 44 : 2419-2428.

Baldwin AK, Simpson A, Steer R, Cain SA et Kielty CM. 2013. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med*, 15 : e8.

Banfi E, Scialino G et Monti-Bragadin C. 2003. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J Antimicrob Chemother*, 52 : 796-800.

Barros L, Ventuizini BA, Baptista P, Estevinho LM et Ferreira ICFR. 2008. Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. *J Agric Food Chem*, 56 : 3856-3862.

Belkherroubi-Sari L, Adida H, Seghir A, Boucherit Z et Boucherit K. 2013. New strategy for enhancing the therapeutic index of Fungizone((R)). *J Mycol Med*, 23 : 3-7.

Bennett MF, Robinson MK, Baron ED et Cooper KD. 2008. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? *J Investig Dermatol Symp Proc*, 13 : 15-19.

Benzie IF et Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239 : 70-76.

Bhasin B, Urekli HM et Atta MG. 2015. Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma. *World J Nephrol*, 4 : 235-244.

Bishop KS, Kao CH, Xu Y, Glucina MP, Paterson RR et Ferguson LR. 2015. From 2000years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*.

Bovi M, Carrizo ME, Capaldi S, Perduca M, Chiarelli LR, Galliano M et Monaco HL. 2011. Structure of a lectin with antitumoral properties in king bolete (*Boletus edulis*) mushrooms. *Glycobiology*, 21 : 1000-1009.

Canada Gd. 2014 (mis à jour le 03-09-2014). Accueil → Santé → Médicaments et produits de santé → Achat et utilisation sécuritaire des produits de santé → Résistance aux antibiotiques → À propos de la résistance aux antibiotiques. Consulté le 23-06-2016, <http://canadiensensante.gc.ca/drugs-products-medicaments-produits/buying-using-achat-utilisation/antibiotic-resistance-antibiotique/about-apropos-fra.php>

Chang TS. 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci*, 10 : 2440-2475.

Chen GT, Ma XM, Liu ST, Liao YL et Zhao GQ. 2012. Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Carbohydr Polym*, 89 : 61-66.

Chen J, Liang RH, Liu W, Luo SJ, Liu CM, Wu SS et Wang ZJ. 2014a. Extraction of pectin from *Premna microphylla turcz* leaves and its physicochemical properties. *Carbohydr Polym*, 102 : 376-384.

Chen JN, Wang YT et Wu JS. 2009. A glycoprotein extracted from golden oyster mushroom *Pleurotus citrinopileatus* exhibiting growth inhibitory effect against U937 leukemia cells. *J Agric Food Chem*, 57 : 6706-6711.

Chen Y, Yin L, Zhang X, Wang Y, Chen Q, Jin C, Hu Y et Wang J. 2014b. Optimization of alkaline extraction and bioactivities of polysaccharides from rhizome of *Polygonatum odoratum*. *Biomed Res Int*, 2014 : 504896.

Cui FJ, Tao WY, Xu ZH, Guo WJ, Xu HY, Ao ZH, Jin J et Wei YQ. 2007. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Bioresour Technol*, 98 : 395-401.

Cui W, Wood PJ, Weisz J et Beer MU. 1999. Nonstarch Polysaccharides from Preprocessed Wheat Bran: Carbohydrate Analysis and Novel Rheological Properties *Cereal Chem*, 76 : 129-133.

Defant A, Mancini I, Matucci R, Bellucci C, Dosi F, Malferrari D et Fabbri D. 2015. Muscarine-like compounds derived from a pyrolysis product of cellulose. *Org Biomol Chem*, 13 : 6291-6298.

Deng G, Lin H, Seidman A, Fornier M, D'Andrea G, Wesa K, Yeung S, Cunningham-Rundles S, Vickers AJ et Cassileth B. 2009. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135 : 1215-1221.

Deray G, Mercadal L et Bagnis C. 2002. Néphrotoxicité de l'amphotéricine B. *Néphrologie*, 23 : 119-122.

Dias DA et Urban S. 2009. HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Nat Prod Commun*, 4 : 489-498.

Dikeman CL, Bauer LL, Flickinger EA et Fahey GC, Jr. 2005. Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of select mushroom varieties. *J Agric Food Chem*, 53 : 1130-1138.

Elmastas M, Turkekul I, Ozturk L, Gulcin I, Isildak O et Aboul-Enein HY. 2006. Antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*) from North Turkey. *Comb Chem High Throughput Screen*, 9 : 443-448.

Fan Y, Wu X, Zhang M, Zhao T, Zhou Y, Han L et Yang L. 2011. Physical characteristics and antioxidant effect of polysaccharides extracted by boiling water and enzymolysis from *Grifola frondosa*. *Int J Biol Macromol*, 48 : 798-803.

Fang J, Wang Y, Lv X, Shen X, Ni X et Ding K. 2012. Structure of a beta-glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating Dectin-1/Syk/NF-kappaB signaling. *Glycoconj J*, 29 : 365-377.

FAO. 2015 (mis à jour le 17-01-2014). Que sont les PFNL? Consulté le 14-06-2015, <http://www.fao.org/forestry/nwfp/6388/fr/>

Farage MA, Miller KW, Elsner P et Maibach HI. 2007. Structural characteristics of the aging skin: a review. *Cutan Ocul Toxicol*, 26 : 343-357.

Farage MA, Miller KW, Elsner P et Maibach HI. 2008a. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci*, 30 : 87-95.

Farage MA, Miller KW, Elsner P et Maibach HI. 2008 b. Functional and physiological characteristics of the aging skin. *Aging Clin Exp Res*, 20 : 195-200.

Farage MA, Miller KW, Elsner P et Maibach HI. 2013. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care* (New Rochelle), 2 : 5-10.

Ferreira IC, Barros L et Abreu RM. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr Med Chem*, 16 : 1543-1560.

Fisher BD et Armstrong D. 1977. Rapid microdilution-colorimetric assay for yeast susceptibility to fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother*, 12 : 614-617.

Fogarty F. 1998. The north American Pine Mushroom *Tricholoma magnivelare* (Peck) Redhead: *in vitro* mycelial culture, ectomycorrhizal synthesis trials and preliminary shiro analysis. University of British Columbia, Vancouver, Canada, 174 p.

Forman HJ et Torres M. 2001. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med*, 22 : 189-216.

Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E et Zouboulis CC. 2012. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol*, 4 : 308-319.

Ganeshpurkar A, Rai G et Jain AP. 2010. Medicinal mushrooms: Towards a new horizon. *Pharmacogn Rev*, 4 : 127-135.

Gévry M-F. 2009. Projet de mise en valeur de produits forestiers non-ligneux dans la communauté de Saint-Thomas Didyme : les champignons forestiers comestibles. Comité Forêt Environnement de Saint-Thomas-Didyme. 69 p.

Gévry M-F, Léveillé C-A, Le Gal G, Fortin J-A et Roy O. 2009. Analyse de commercialisation des champignons forestiers sauvages à potentiel commercial du Québec. *Biopierre*. 103 p.

Gévry M-F, Simard D, Roy G. 2009. Champignons comestibles du Lac-Saint-Jean. Forêt modèle du Lac-Saint-Jean. 68 p.

Girard-Lalancette K, Pichette A et Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chem*, 115 : 720-726.

Glasauer A et Chandel NS. 2014. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol*, 92 : 90-101.

Goldstein IJ, Winter HC, Aurandt J, Confer L, Adamson JT, Hakansson K et Remmer H. 2007. A new alpha-galactosyl-binding protein from the mushroom *Lyophyllum decastes*. *Arch Biochem Biophys*, 467 : 268-274.

Guo YJ, Deng GF, Xu XR, Wu S, Li S, Xia EQ, Li F, Chen F, Ling WH et Li HB. 2012. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. *Food Funct*, 3 : 1195-1205.

Gursoy N, Sarikurkcu C, Cengiz M et Solak MH. 2009. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Food and Chemical Toxicology*, 47 : 2381-2388.

Han C et Cui B. 2012. Pharmacological and pharmacokinetic studies with agaricoglycerides, extracted from *Grifola frondosa*, in animal models of pain and inflammation. *Inflammation*, 35 : 1269-1275.

Hanson JR. 2003. *Natural Products : The Secondary Metabolites*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Angleterre, 147 p.

Hattori Y, Kasai K et Gross SS. 2004. NO suppresses while peroxynitrite sustains NF-kappaB: a paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO. *Cardiovasc Res*, 63 : 31-40.

Heleno SA, Barros L, Sousa MJ, Martins A et Ferreira ICFR. 2010. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chem*, 119 : 1443-1450.

Helfrich YR, Sachs DL et Voorhees JJ. 2008. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs*, 20 : 177-183; quiz 184.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge

S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ et Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, 111 : 509-547.

Hobbs C. 2002. *Medicinal Mushrooms : An Exploration of Tradition, Healing and Culture*. Book Publishing Company, Summertown, Tennessee, États-Unis, 402 p.

Huang M, Zhang S, Zhang M, Ou S et Pan Z. 2012. Effects of polysaccharides from *Morchella conica* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94 : 763-771.

Hussain SH, Limthongkul B et Humphreys TR. 2013. The biomechanical properties of the skin. *Dermatol Surg*, 39 : 193-203.

Hyde KD, Bahkali AH et Moslem MA. 2010. Fungi—an unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity*, 43 : 1-9.

Hyde KD, Chomnunti P, Crous PW, Groenewald JZ, Damm U, Ko Ko TW, Shivas RG, Summerell BA et Tan YP. 2010. A case for re-inventory of Australia's plant pathogens. *Persoonia*, 25 : 50-60.

Industrie Canada. 2015 (mis à jour le 2014-11-14). Culture de champignons : Données sur le commerce en direct. Consulté le 26-03-2015, <https://www.ic.gc.ca/app/scr/tdst/tdo/crtr.html?naArea=9999&toFromCountry=CDN&grouped=GROUPE&runReport=true&countryList=ALL¤cy=CDN&productType=NAICS&searchType=BL&hSelectedCodes=111411&reportType=TB&timePeriod=5%7CComplete+Years&lang=fra>

Jacobson RG et Flowers FP. 1996. Skin changes with aging and disease. *Wound Repair Regen*, 4 : 311-315.

Kammeyer A et Luiten RM. 2015. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*, 21C : 16-29.

Kocic G, Pavlovic D, Jevtovic T, Kocic R, Bojic A, Vlahovic P, Djordjevic V, Sokolovic D et Djindjic B. 2001. Oxidative modification of rat liver 5'-nucleotidase: the mechanisms for protection and re-activation. *Arch Physiol Biochem*, 109 : 323-330.

Kodama N, Komuta K et Nanba H. 2003. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients. *J Med Food*, 6 : 371-377.

Kodama N, Komuta K, Sakai N et Nanba H. 2002. Effects of D-Fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa* on tumor growth involve activation of NK cells. *Biol Pharm Bull*, 25 : 1647-1650.

Kodama N, Murata Y, Asakawa A, Inui A, Hayashi M, Sakai N et Nanba H. 2005. Maitake D-Fraction enhances antitumor effects and reduces immunosuppression by mitomycin-C in tumor-bearing mice. *Nutrition*, 21 : 624-629.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H et Moilanen E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4 : 471-479.

Kosentka P, Sprague SL, Ryberg M, Gartz J, May AL, Campagna SR et Matheny PB. 2013. Evolution of the toxins muscarine and psilocybin in a family of mushroom-forming fungi. *PLoS One*, 8 : e64646.

Kuo M. 2003. *Hypomyces lactifluorum*: The lobster mushroom. Consulté le 02-04-2015, http://www.mushroomexpert.com/hypomyces_lactifluorum.html

Kuo M. 2005. *Verpa bohemica*. Consulté le 02-04-2015, http://www.mushroomexpert.com/verpa_bohemica.html

Kuo M. 2006. The American Matsutake : *Tricholoma magnivelare*. Consulté le 02-04-2015, http://www.mushroomexpert.com/tricholoma_magnivelare.html

Kuo M. 2010a. *Grifola frondosa* : The hen of the woods. Consulté le 02-04-2015, http://www.mushroomexpert.com/grifola_frondosa.html

Kuo M. 2010b. *Pycnoporus cinnabarinus*. Consulté le 09-06-2015, http://www.mushroomexpert.com/pycnoporus_cinnabarinus.html

Kuo M. 2010c. *Boletus edulis*. Consulté le 02-04-2015, http://www.mushroomexpert.com/boletus_edulis.html

Kuo M. 2010d. *Gloeophyllum sepiarium*. Consulté le 14-04-2015, http://www.mushroomexpert.com/gloeophyllum_sepiarium.html

Kuo M. 2011. *Cortinarius carperatus*. Consulté le 02-04-2015, http://www.mushroomexpert.com/cortinarius_caperatus.html

Kuo M. 2015a. *Craterellus cornucopioides*. Consulté le 02-04-2015, http://www.mushroomexpert.com/craterellus_cornucopioides.html

Kuo M. 2015b. *Craterellus tubaeformis*. Consulté le 02-04-2015, http://www.mushroomexpert.com/craterellus_tubaeformis.html

Kuo M. 2015c. *Cantharellus "cibarius"*. Consulté le 09-06-2015, http://www.mushroomexpert.com/cantharellus_cibarius.html

Labbé R. 2014a. *Craterellus fallax* / Fausse corne d'abondance (Trompette de la mort). Consulté le 02-04-2015, <http://www.mycoquebec.org/bas.php?l=r&nom=Craterellus%20fallax%20/%20Fausse%20corne%20d%27abondance&post=Craterellus&gro=11&tag=Craterellus%20fallax>

Labbé R. 2014 b. *Hydnum umbilicatum* / Hydne ombiliqué. Consulté le 02-04-2015, <http://www.mycoquebec.org/bas.php?l=r&nom=Hydnum%20umbilicatum%20/%20Hydne%20ombiliqu%C3%A9&post=Hydnum&gro=53&tag=Hydnum%20umbilicatum>

Labbé R. 2014c. *Morchella elata* s.l./ Morille noire Consulté le 02-04-2015, <http://www.mycoquebec.org/bas.php?l=r&nom=Morchella%20elata%20/%20Morille%20Noire&post=Morchella&gro=3&tag=Morchella%20elata>

Laboratoire Pachaloha. 2015. Boutique : Crème au chaga. Consulté le 30-03-2015, <https://pachaloha.com/fr/produit/creme-au-chaga/>

Legault J, Girard-Lalancette K, Grenon C, Dussault C et Pichette A. 2010. Antioxidant activity, inhibition of nitric oxide overproduction, and in vitro antiproliferative effect of maple sap and syrup from *Acer saccharum*. *J Med Food*, 13 : 460-468.

Lemieszek MK, Cardoso C, Nunes FHF, de Barros AIRNA, Marques G, Pozarowski P et Rzeski W. 2013. *Boletus edulis* biologically active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells. *Food Funct*, 4 : 575-585.

Lull C, Wichers HJ et Savelkoul HF. 2005. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm*, 2005 : 63-80.

Luo AX, Luo AS, Huang JD et Fan YJ. 2012. Purification, Characterization and Antioxidant Activities in Vitro and in Vivo of the Polysaccharides from *Boletus edulis* Bull. Molecules, 17 : 8079-8090.

Ma L, Chen H, Dong P et Lu X. 2013. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. Food Chem, 139 : 503-508.

Makpol S, Azura Jam F, Anum Mohd Yusof Y et Zurinah Wan Ngah W. 2011. Modulation of collagen synthesis and its gene expression in human skin fibroblasts by tocotrienol-rich fraction. Arch Med Sci, 7 : 889-895.

Maltais-Lajoie P-A. 2013. L'économie des produits forestiers non-ligneux : secteur des champignons forestiers. MAPAQ, 39 p.

Martin G et Darveau A. 2010. Le projet champignon : vers un projet intégré de commercialisation collective du Saguenay-Lac-Saint-Jean. Forêt modèle du Lac-Saint-Jean, 117p

Masuda Y, Ito K, Konishi M et Nanba H. 2010. A polysaccharide extracted from *Grifola frondosa* enhances the anti-tumor activity of bone marrow-derived dendritic cell-based immunotherapy against murine colon cancer. Cancer Immunol Immunother, 59 : 1531-1541.

Matsui K, Kodama N et Nanba H. 2001. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the carcinoma angiogenesis. Cancer Lett, 172 : 193-198.

McCullough JL et Kelly KM. 2006. Prevention and treatment of skin aging. Ann N Y Acad Sci, 1067 : 323-331.

Ministère de l'Énergie et des Ressources Naturelles. 2015. Bref portrait de la forêt boréale au Québec. Consulté le 16-04-2015, <http://www.mern.gouv.qc.ca/presse/feux-grands.jsp>

[Nanba H, Hamaguchi A et Kuroda H. 1987.](#) The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruit bodies of *Grifola frondosa* (maitake). Chem Pharm Bull (Tokyo), 35 : 1162-1168.

Naylor EC, Watson RE et Sherratt MJ. 2011. Molecular aspects of skin ageing. Maturitas, 69 : 249-256.

Niemelä T. 1985. Mycoflora of Poste-de-la-Baleine, Northern Quebec. Polypores and the Hymenochaetales. *Naturaliste Canadien*, 112 : 445-472.

O'Brien J, Wilson I, Orton T et Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267 : 5421-5426.

Ohno N, Suzuki I, Oikawa S, Sato K, Miyazaki T et Yadomae T. 1984. Antitumor activity and structural characterization of glucans extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 32 : 1142-1151.

OMS. 2015. Centre des médias → Aide-mémoire → Résistance aux antibiotiques. Consulté le 23-06-2016, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/>

[Ou B, Hampsch-Woodill M et Prior RL. 2001.](#) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*, 49 : 4619-4626.

Ozen T, Darcan C, Aktop O et Turkekul I. 2011. Screening of Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Contents of Edible Mushrooms Wildly Grown in the Black Sea Region of Turkey. *Comb Chem High Throughput Screen*, 14 : 72-84.

Palacios I, Lozano M, Moro C, D'Arrigo M, Rostagno MA, Martinez JA, Garcia-Lafuente A, Guillamon E et Villares A. 2011. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chem*, 128 : 674-678.

Penesyan A, Gillings M et Paulsen IT. 2015. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. *Molecules*, 20 : 5286-5298.

Phaniendra A, Jestadi DB et Periyasamy L. 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*, 30 : 11-26.

Pillai S, Oresajo C et Hayward J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci*, 27 : 17-34.

Poljsak B et Dahmane R. 2012. Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatol Res Pract*, 2012 : 135206.

Rago R, Mitchen J et Wilding G. 1990. DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Anal Biochem*, 191 : 31-34.

Rajeswari A et Varalakshmi P. 2006. Low molecular weight heparin protection against oxalate-induced oxidative renal insult. *Clin Chim Acta*, 370 : 108-114.

Raven PH, Evert, R.F., Eichhorn, S.E. 2000. *Biologie végétale*. De Boeck Université, Paris, France, 944 p.

Raven PH, Johnson, G.B., Mason, K.A., Losos, J.B., Singer, S.R. 2014. *Biologie*, 3ème édition. De Boeck Supérieur, Bruxelles, Belgique, 1279 p.

Ripert C. 2013. *Mycologie médicale*. Lavoisier, 750 p.

Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guiland JC, Lorgis L, Cottin Y et Vergely C. 2013. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther*, 140 : 239-257.

Rochon C, Pare D, Khasa DP et Fortin JA. 2009. Ecology and management of the lobster mushroom in an eastern Canadian jack pine stand. *Canadian Journal of Forest Research*, 39 : 2080-2091.

Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK, Prasad GB et Bisen PS. 2009. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol*, 10 : 717-742.

Santoyo S, Ramirez-Anguiano AC, Aldars-Garcia L, Reglero G et Soler-Rivas C. 2012. Antiviral activities of *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* extracts and polysaccharide fractions against Herpes simplex virus type 1. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51 : 225-235.

Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C et Wlaschek M. 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol*, 35 : 307-316.

Shomori K, Yamamoto M, Arifuku I, Teramachi K et Ito H. 2009. Antitumor effects of a water-soluble extract from Maitake (*Grifola frondosa*) on human gastric cancer cell lines. *Oncol Rep*, 22 : 615-620.

Smania A, Jr., Marques CJ, Smania EF, Zanetti CR, Carobrez SG, Tramonte R et Loguercio-Leite C. 2003. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytother Res*, 17 : 1069-1072.

Soares R, Meireles M, Rocha A, Pirraco A, Obiol D, Alonso E, Joos G et Balogh G. 2011. Maitake (D fraction) mushroom extract induces apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation. *J Med Food*, 14 : 563-572.

Société canadienne du cancer. 2015. Effets secondaires de la chimiothérapie. Consulté le 27-03-2015, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/chemotherapy-and-other-drug-therapies/chemotherapy/side-effects-of-chemotherapy/?region=qc>

[Solano F, Briganti S, Picardo M et Ghanem G. 2006.](#) Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res*, 19 : 550-571.

Speeckaert R, Van Gele M, Speeckaert MM, Lambert J et van Geel N. 2014. The biology of hyperpigmentation syndromes. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27 : 512-524.

Statistique Canada. 2015 (mis à jour le 22-06-2015). Tableau 001-0012 : Superficie, production et vente de champignons. Consulté le 19-11-2015, <http://www5.statcan.gc.ca/cansim/a26?lang=fra&retrLang=fra&id=0010012&pattern=&stByVal=1&p1=1&p2=38&tabMode=dataTable&csid=>

Sturm RA, Box NF et Ramsay M. 1998. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays*, 20 : 712-721.

Sugar AM. 1995. Use of Amphotericin B with Azole Antifungal Drugs : What Are We Doing ? *Antimicrob Agents Chemother*, 39 : 1907-1912.

Sulkowska-Ziaja K, Muszynska B, Motyl P, Pasko P et Ekiert H. 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity in some species of polyporoid mushrooms from Poland. *Int J Med Mushrooms*, 14 : 385-393.

Thannickal VJ et Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279 : 1005-1028.

Tracey KJ. 2002. The inflammatory reflex. *Nature*, 420 : 853-859.

Tremblay E et Olivier A. 2011. Les champignons forestiers comestibles : Évaluation de la ressource et perspectives de développement dans le contexte du nouveau régime forestier. Université Laval; Faculté de foresterie, de géographie et de géomatique. 89 p.

Tsai SY, Tsai HL et Mau JL. 2007. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *Lwt-Food Science and Technology*, 40 : 1392-1402.

Turkoglu A, Kivrak I, Mercan N, Duru ME, Gezer K et Turkoglu H. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *African Journal of Biotechnology*, 5 : 1146-1150.

Tyls F, Palenicek T et Horacek J. 2014. Psilocybin--summary of knowledge and new perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24 : 342-356.

Ueda N et Shah SV. 1992. Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells. *J Clin Invest*, 90 : 2593-2597.

Ulbricht C, Weissner W, Basch E, Giese N, Hammerness P, Rusie-Seamon E, Varghese M et Woods J. 2009. Maitake mushroom (*Grifola frondosa*): systematic review by the natural standard research collaboration. *J Soc Integr Oncol*, 7 : 66-72.

Umene K, Oohashi S, Yoshida M et Fukumaki Y. 2008. Diversity of the a sequence of herpes simplex virus type 1 developed during evolution. *J Gen Virol*, 89 : 841-852.

Vamanu E et Nita S. 2013. Antioxidant Capacity and the Correlation with Major Phenolic Compounds, Anthocyanin, and Tocopherol Content in Various Extracts from the Wild Edible *Boletus edulis* Mushroom. *Biomed Res Int*.

Vamanu E et Nita S. 2014. Bioactive Compounds, Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from *Cantharellus cibarius*. *Revista De Chimie*, 65 : 372-379.

Videira IF, Moura DF et Magina S. 2013. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 88 : 76-83.

Vidovic SS, Mujic IO, Zekovic ZP, Lepojevic ZD, Tumbas VT et Mujic AI. 2010. Antioxidant Properties of Selected Boletus Mushrooms. *Food Biophysics*, 5 : 49-58.

Wang D, Sun SQ, Wu WZ, Yang SL et Tan JM. 2014. Characterization of a water-soluble polysaccharide from *Boletus edulis* and its antitumor and immunomodulatory activities on renal cancer in mice. *Carbohydr Polym*, 105 : 127-134.

Wang FW. 2012. Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. *Chin J Nat Med*, 10 : 72-76.

Wang Y, Fang J, Ni X, Li J, Liu Q, Dong Q, Duan J et Ding K. 2013. Inducement of cytokine release by GFPBW2, a novel polysaccharide from fruit bodies of *Grifola frondosa*, through dectin-1 in macrophages. *J Agric Food Chem*, 61 : 11400-11409.

Wasser SP. 2014. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J*, 37 : 345-356.

Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJ, Perstin J, Preston TJ, Wiley MJ et Wong AW. 2009. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci*, 108 : 4-18.

Winder RS. 2006. Cultural studies of *Morchella elata*. *Mycol Res*, 110 : 612-623.

Wright JA, Richards T et Srail SK. 2014. The role of iron in the skin and cutaneous wound healing. *Front Pharmacol*, 5 : 156.

Wu SJ, Lu TM, Lai MN et Ng LT. 2013. Immunomodulatory activities of medicinal mushroom *Grifola frondosa* extract and its bioactive constituent. *Am J Chin Med*, 41 : 131-144.

Yaar M et Gilchrest BA. 2007. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol*, 157 : 874-887.

Yeh JY, Hsieh LH, Wu KT et Tsai CF. 2011. Antioxidant properties and antioxidant compounds of various extracts from the edible basidiomycete *Grifola frondosa* (Maitake). *Molecules*, 16 : 3197-3211.

Zhang AQ, Xiao NN, He PF et Sun PL. 2011. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of polysaccharides extracted from *Boletus edulis*. *Int J Biol Macromol*, 49 : 1092-1095.

Zhang L et Falla TJ. 2009. Cosmeceuticals and peptides. *Clin Dermatol*, 27 : 485-494.

Zheng CJ, Xu LL, Li YY, Han T, Zhang QY, Ming QL, Rahman K et Qin LP. 2013. Cytotoxic metabolites from the cultures of endophytic fungi from *Panax ginseng*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97 : 7617-7625.